ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่พัฒนาขึ้นใหม่

ANTIBACTERIAL PROPERTY OF NEWLY DEVELOPED 2% CHLORHEXIDINE GEL AGAINST ENTEROCOCCUS FAECALIS

ศิริลักษณ์ คำประพันธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2566

ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่พัฒนาขึ้นใหม่

ศิริลักษณ์ คำประพันธ์

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ANTIBACTERIAL PROPERTY OF NEWLY DEVELOPED 2% CHLORHEXIDINE GEL AGAINST ENTEROCOCCUS FAECALIS

SIRILUK KHAMPRAPHAN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Clinical Dentistry)

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2023

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่พัฒนาขึ้นใหม่

ของ

ศิริลักษณ์ คำประพันธ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาทันตกรรมคลินิก
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.ชินาลัย ปิยะชน)

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.วีระ เลิศจิราการ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ทพ.วิบุลย์ ไพศาลกอบฤทธิ์)

ชื่อเรื่อง	ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่พัฒนาขึ้นใหม่
ผู้วิจัย	ศิริลักษณ์ คำประพันธ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ. ชินาลัย ปิยะชน

เจลคลอเฮกซิดีนเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง แต่จนถึงปัจจุบันไม่มีการผลิตและนำเข้าจำหน่ายในประเทศไทย คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 เพื่อใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟัน ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เจลคอนเซปซิสวีและสารละลายคลอเฮกซิดีนด้วยวิธีทดสอบการแพร่บนวุ้น ทดสอบรอบละ 3 เพลทซ้ำ 3 ครั้ง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งที่1,7,14 ,21 วัน เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งของยา 3 ชนิดในแต่ละช่วงเวลาด้วยสถิติความแปรปรวนสองทางแบบวัดซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งของที่1,7,14,21 วันของยาชนิดเดียวกันด้วยสถิติความแปรปรวนทางเดียวแบบวัดซ้ำ จากนั้นหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อได้เปรียบเทียบเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคอนเซปซิสวี ผลการศึกษาพบว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นที่ 1,7,14,21 วัน มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเท่ากับ 16.8 ± 0.60, 17.4 ± 0.63, 18.3 ± 0.75, 18.2 ± 0.75 มม.เจลคอนเซปซิสวีที่ 1,7,14,21 วันมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเท่ากับ 17.1± 0.85, 17.7 ± 0.66, 18.5 ± 0.75, 18.3 ± 0.61 มม. เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคอนเซปซิสวีมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งไม่แตกต่างกัน สารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งที่ 1,7,14,21 วันเท่ากับ 20.2 ± 0.5, 21.0 ± 1.1, 21.5 ± 1.2, 20.6 ± 1.1 มม. โดยเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคอนเซปซิสวีมีค่าน้อยกว่าสารละลายคลอเฮกซิดีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบผลที่ 14,21 วัน พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่พัฒนาขึ้นและเจลคอนเซปซิสวีมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งไม่แตกต่างกัน ในขณะที่สารละลายคลอเฮกซิดีนมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งในวันที่ 21 ลดลงเมื่อเทียบกับวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมากกว่าเจลคอนเซปซิสวี แต่มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเท่ากันคือ 312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สรุปได้ว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสและยามีความคงตัวของประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไม่แตกต่างกับเจลคอนเซปซิสวี

คำสำคัญ : เอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส, เจลคลอเฮกซิดีน, เจลคอนเซปซิสวี, โซนการยับยั้ง

Title	ANTIBACTERIAL PROPERTY OF NEWLY DEVELOPED 2% CHLORHEXIDINE GEL AGAINST ENTEROCOCCUS FAECALIS
Author	SIRILUK KHAMPRAPHAN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2023
Thesis Advisor	Asst. Prof. Chinalai Piyachon

Chlorhexidine (CHX) gel is a highly effective antibacterial agent. Currently, there are no domestically produced or imported products for sale in Thailand. Therefore, we came up with our idea of developing a 2% CHX gel at the Faculty of Dentistry at Srinakharinwirot University for using as intracanal medicament. This preliminary study aimed to compare the efficacy of the newly developed CHX gel against *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis)* compared to the commercial product, i.e., ConsepsisV and 2% CHX solution. An agar diffusion test was performed in a triplicate for each test and repeated three times. The mean diameters of inhibition zones were measured at 1, 7, 14, 21 days. The Two-Way repeated measure ANOVA was used to compare the mean diameters of inhibition zones of three medications in each time period. The One-Way repeated measure ANOVA was used to compare the mean diameters of the inhibition zones of each medication at different periods of time. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by using the microdilution method. The results showed that the inhibition zone of newly developed CHX gel at 1,7,14,21 day was 16.8 ± 0.60, 17.4 ± 0.63, 18.3 ± 0.75, 18.2 ± 0.75 mm. The inhibition zone of ConsepsisV was 17.1 ± 0.85, 17.7 ± 0.66, 18.5 ± 0.75, 18.3 ± 0.61 mm. There was no significant difference between inhibition zones of newly developed CHX gel and ConsepsisV at every time point. The inhibition zone of CHX solution was 20.2 ± 0.5, 21.0 ± 1.1, 21.5 ± 1.2, 20.6 ± 1.1 mm. However, both CHX gel and Consepsis V showed significantly lower antibacterial properties than CHX solution. At day14 and 21,the newly developed CHX gel and ConsepsisV showed no significant differences in the diameter of inhibition zones. On the contrary, inhibition zones of CHX solution on day 21 were significantly lower than those of day 14. The MIC of newly developed CHX gel was higher than ConsepsisV, while its MBC equally value was 312 µg/ml. It was concluded that our newly developed 2% CHX gel is an effective and stable antibacterial agent against *E faecalis,* compared to ConsepsisV.

Keyword : Enterococcus faecalis, Chlorhexidine gel, ConsepsisV, Inhibition zone

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ. ชินาลัย ปิยะชน ในการให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนได้ตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนกระทั่งดำเนินการเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณอ.ดร.สิริรัตน์ บุญดิเรก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้ช่วยสอนและให้คำแนะนำตลอดในการดำเนินงานวิจัยในด้านจุลชีววิทยา

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิทยาเอ็นโดดอนต์และคณาจารย์ภาควิชาโอษฐวิทยาที่ได้เมตตาสอนสั่งให้ความรู้และคำแนะนำที่ดีตลอดช่วงเวลาของการศึกษา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ บุคลากรประจำภาควิชาที่เมตตาสั่งสอนและช่วยเหลือตลอดในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบพระคุณอ.ดร.ทพญ.จารุมา ศักดิ์ดี Dr. Antonio Vera และ Dr. Judy Chen ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์การทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณครอบครัวและเพื่อนรอบข้างของข้าพเจ้าที่ได้ให้กำลังใจและส่งเสริมสนับสนุนในการศึกษาเล่าเรียนครั้งนี้จนสำเร็จการศึกษา

ศิริลักษณ์ คำประพันธ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

คำถามงานวิจัย 4

ความมุ่งหมายของงานวิจัย 4

ความสำคัญของการวิจัย 4

ขอบเขตของการวิจัย 4

นิยามศัพท์เฉพาะ 5

กรอบแนวคิดในงานวิจัย 6

สมมุติฐานในการวิจัย 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7

กลไกการออกฤทธิ์ของคลอเฮกซิดีน 7

รูปแบบของคลอเฮกซิดีนที่นำมาใช้ในงานเอ็นโดดอนติกส์ 8

เจลคลอเฮกซิดีน 10

เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส 12

วิธีการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อ 12

1.วิธีทดสอบด้วยการแพร่บนวุ้น (Agar diffusion test) 13
2. วิธีทดสอบด้วยการเจือจาง (Broth dilution test) 14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 17
จำนวนกลุ่มตัวอย่าง 17
การคัดเลือกเชื้อที่ใช้ในการทดลอง 17
วัสดุและสารเคมีที่ใช้ 17
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลอง 18
วิธีการเตรียมเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 20
การทดสอบการต้านเชื้อของสารคลอเฮกซิดีนต่อเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสด้วยวิธีการทดสอบการแพร่บนวุ้น[16, 58] (Disk diffusion) 20
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration;MIC) 23
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ(Minimum Bactericidal Concentration;MBC) 26
การวิเคราะห์ผล 26
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย 27
การเตรียมเจลคลอเฮกซิดีน 27
การทดสอบประสิทธิภาพของเจลคลอเฮกซิดีนในการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสด้วยวิธีการทดสอบการแพร่บนวุ้น 27
ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีน 30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 33
สรุปผลการวิจัย 33
การอภิปรายผล 33
ข้อเสนอแนะ 39

บรรณานุกรม 40

ภาคผนวก 46

ประวัติผู้เขียน 56

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสในหน่วยมิลลิเมตร (mean ±SD) 28

ตาราง 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ..... 32

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดวิจัย 6

ภาพประกอบ 2 โครงสร้างโมเลกุลของคลอเฮกซิดีน 7

ภาพประกอบ 3 โครงสร้างไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส[39] 11

ภาพประกอบ 4 การทดสอบด้วยวิธี Macrodilution test [49] 14

ภาพประกอบ 5 การทดสอบด้วยวิธี Microdilution test [49] 15

ภาพประกอบ 6 การเกิดปฏิกิริยาของสารรีซาซูรินทำให้สารเปลี่ยนเป็นสีชมพู[52] 15

ภาพประกอบ 7 การเตรียมจานเพาะเชื้อเพื่อทดสอบด้วยวิธีแพร่บนวุ้น 21

ภาพประกอบ 8 ภาพ A แสดงอุปกรณ์ที่มีการเจาะรูขนาดเท่ากับเลนส์กล้องและขีดเส้นวงกลมให้เพลทวางตำแหน่งเดิม ภาพ B แสดงการวางเพลทและวางกล้องถ่ายรูป ภาพ C แสดงการวางกล้องให้แนบกับอุปกรณ์ ภาพ D ภาพตัวอย่างที่ได้หลังการถ่ายรูป 22

ภาพประกอบ 9 การเกิดโซนการยับยั้ง 22

ภาพประกอบที่ 10 การทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แถว A B C เป็นกลุ่มคลอเฮกซิดีนเจลที่พัฒนาขึ้น แถว D E F เป็นกลุ่มคลอเฮกซิดีนเจลคอนเซปซิสวี แถว G H เป็นกลุ่มควบคุมลบที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำกลั่นตามลำดับ 24

ภาพประกอบที่ 11 ลักษณะของเจลคลอเฮกซิดีนภายหลังการผสมแล้ว 27

ภาพประกอบที่ 12 การลากเส้นเพื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสด้วยโปรแกรมแอนไทโบโอแกรมเจ เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน (ภาพ A) และ 21 วัน (ภาพ B) โดย 1 คือเจลคลอเฮกซิดีนเจลที่พัฒนาขึ้น 2 คือสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ2 3 คือเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี และ 4 คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 28

ภาพประกอบที่ 13 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น เจล คลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี และสารละลายคลอเฮกซิดีนที่ระยะเวลาต่างๆ 29

ภาพประกอบ 14 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนและเจลคอนเซปซิสวีโดยดูการตกตะกอนด้วยตา 30

ภาพประกอบที่ 15 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนและเจลคอนเซปซิสวีโดยการใช้อะลามาร์บลู 31

ภาพประกอบที่ 16 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส ภาพ A เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเท่ากับ 312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภาพ B เจลคอนเซปซิสวีมีความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเท่ากับ 312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ลูกศรสีแดงแสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุด) 31

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

การติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในคลองรากฟัน[1] โดยแบคทีเรียภายในคลองรากฟันมีการเจริญอยู่แบบเดี่ยว (planktonic cells) หรือการเจริญอยู่ร่วมกันเป็นลักษณะของแผ่นชีวภาพ (biofilm)[2] ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มักจะมีการรวมกลุ่ม (colonization) เข้าไปในท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) ส่วนคอด (isthmus) คลองรากแขนง (accessory canal) และแขนงคลองรากฟันส่วนปลาย (apical ramification) ซึ่งเป็นบริเวณที่ยากต่อการนำเครื่องมือหรือใส่ยาลงไปในคลองรากฟัน[3] สาเหตุที่คลองรากฟันที่ได้รับการรักษารากฟันแล้วเกิดความล้มเหลวเกิดจากการควบคุมการติดเชื้อในคลองรากฟันไม่เพียงพอ และมีสาเหตุหลักคือการติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อการรักษา (persistent infection) ภายในคลองรากฟันหรือบริเวณเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน[4] โดยแบคทีเรียที่พบในคลองรากฟันที่รักษารากฟันแล้วล้มเหลว มักจะพบแบคทีเรียชนิดแกรมบวกชนิดที่เจริญได้ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน(anaerobic bacteria) และกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส (Enterococcus faecalis) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 29 และ 38 ในคลองรากฟันที่ล้มเหลวภายหลังการรักษาคลองรากฟัน [5, 6]

การรักษาคลองรากฟันมีวัตถุประสงค์ในการควบคุมหรือกำจัดเชื้อจุลชีพด้วยการทำความสะอาดคลองรากฟัน โดยการใช้เครื่องมือในการตัดผนังเนื้อฟันที่มีการติดเชื้อเป็นส่วนสำคัญ แต่บางบริเวณเช่นคลองรากแขนง และภายในท่อเนื้อฟันซึ่งมีขนาดเล็ก เป็นบริเวณที่ไม่สามารถใช้เครื่องมือสัมผัสได้โดยตรง จึงจำเป็นต้องใช้น้ำยาล้างคลองรากฟันและยาใส่ในคลองรากฟัน โดยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide) เป็นยาที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการเป็นยาใส่ในคลองรากฟัน เนื่องจากมีประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อกว้าง แต่เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสและแคนดิดาอัลบิแคนส์มีความทนทานต่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์[7]

ปัจจุบันคลอเฮกซิดีนเป็นยาที่ถูกนำมาใช้มากในงานรักษาคลองรากฟัน เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสที่อยู่ในท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule) Krithikadatta และคณะ[8]ได้เปรียบเทียบการใช้เจลคลอเฮกซิดีน เจลเมโทรนิดาโซล ไบโอแอคทีฟกลาส และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในการใส่เป็นยาในคลองรากฟัน ผลการศึกษาพบว่าเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเจลเมโทรนิดาโซล ไบโอแอคทีฟกลาสและแคลเซียมไฮดรอกไซด์

คลอเฮกซิดีนมีความเป็นเบสและมีความเสถียรในรูปของเกลือ ในการนำมาใช้งานจึงอยู่ในรูปของคลอเฮกซิดีนไดกลูโคเนต (Chlorhexidine digluconate) ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ โดยรูปแบบของคลอเฮกซิดีนที่นำมาใช้ในทางทันตกรรมมีทั้งรูปที่เป็นของเหลว (solution) ในการล้างคลองรากฟันและรูปที่เป็นเจลเป็นยาใส่ในคลองรากฟันระหว่างการรักษา [9]

จากการศึกษาของ Paquetteและคณะ[10]ได้ศึกษาประสิทธิภาพของคลอเฮกซิดีนรูปที่เป็นของเหลวที่ใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟันในมนุษย์ ใช้วิธีในการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Colony Forming Unit) แต่เนื่องจากมีส่วนน้อยที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องทดลองได้ จึงใช้วิธีการย้อมสีแบคทีเรียแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อีพีไอฟลูออเรสเซนต์ (epifluorescence microscopy) โดยแบ่งช่วงของการนับเชื้อในขั้นตอนการเปิดทางเข้าสู่คลองรากฟันแล้วจึงเรียกผู้ป่วยกลับมาเพื่อนับจำนวนเชื้ออีกครั้งในขั้นตอนการล้างและใส่ยาด้วยคลอเฮกซิดีน ผลการศึกษาพบว่าการใช้สารละลายคลอเฮกซิดีนเป็นยาที่ใส่ในคลองรากฟันทำให้เกิดการกลับมาของแบคทีเรียระหว่างช่วงของการศึกษา จึงแนะนำพัฒนาคลอเฮกซิดีนรูปแบบทางเลือกอื่นเช่น รูปแบบเจล หรือรูปแบบที่มีระบบควบคุมการปลดปล่อยและนำส่งยา (controlled release delivery) แต่มีบางการศึกษาที่พบว่าสารละลายคลอเฮกซิดีนมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ดีไม่แตกต่างกับรูปแบบเจล[11]สอดคล้องกับการศึกษาของ Ferraz และคณะ[12]พบว่าสารละลายคลอเฮกซิดีนและเจลคลอเฮกซิดีนที่นำมาใส่ในคลองรากฟันในระดับความเข้มข้นเท่ากันมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสอย่างมีนัยสำคัญ

คลอเฮกซิดีนในรูปของเจลมีข้อดีคือมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันต่ำ เนื่องจากความหนืดของเจลจะช่วยทำให้สารแอคทีฟ (active agent) สัมผัสกับผนังคลองรากฟันและท่อเนื้อฟันในฟัน [13] จากการศึกษาของ Gomes-Filho และคณะ[14] พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนเกิดการตอบสนองต่อการอักเสบเริ่มต้นในระดับต่ำที่ 48 ชั่วโมงและ14 วัน โดยเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน การตอบสนองต่อการอักเสบจะลดลงมากกว่ารูปแบบสารละลายอย่างมีนัยสำคัญ โดยความเข้มข้นของเจลคลอเฮกซิดีนที่ใช้ใส่ในคลองรากฟันมีช่วงของความเข้มข้นค่อนข้างกว้างตั้งแต่ร้อยละ 0.2 ถึง 2[15] จากการศึกษาของ Barsani และคณะ[16]ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสด้วยวิธีการแพร่บนวุ้นของเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 และความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ผลจากการศึกษาพบว่าเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 มี

ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสมากกว่าความเข้มข้นร้อยละ 0.2 อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อศึกษาผลกระทบ (adverse effect) ของเจลคลอเฮกซิดีน จากการศึกษาของ Afridi และคณะ[17] ได้ทำการศึกษาแบบสุ่มทางคลินิก (Randomized clinical trials) ของผู้ป่วยในฟันที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นเนื้อเยื่อในตายและมีอาการอักเสบรอบปลายรากฟัน โดยเปรียบเทียบอาการปวดหลังการใส่ยาในคลองรากฟันของเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ผลการศึกษาพบว่ายาทั้งสองชนิดนี้ช่วยลดอาการปวดภายหลังการใส่ยาได้อย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ไม่ได้ส่งผลให้เกิดอาการปวดหลังการรักษารากฟัน (flare-ups) เพิ่มขึ้นและไม่ได้ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน จึงสามารถใช้เจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นยาใส่ในคลองรากฟันได้เพื่อให้มีฤทธิ์กำจัดเชื้อมากที่สุดโดยไม่เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย

เจลคลอเฮกซิดีนมีสารก่อเจล (gelling agent) หรือโพลีเมอร์เป็นองค์ประกอบในการสร้างเจลที่แตกต่างกัน จากการศึกษาของ Mathew และคณะ[18]ประเมินการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสและเชื้อราอัลบิแคนส์ของเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟัน โดยการเตรียมเจลคลอเฮกซิดีนจากสารละลายคลอเฮกซิดีนและใช้สารก่อเจลไฮดรอกซีเอทิล เซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่เข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อและละลายน้ำได้ เปรียบเทียบกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับสารละลายคลอเฮกซิดีน แคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ออคทินีดีน และออคทินีดีนผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 และออคทินีดีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสและเชื้อราอัลบิแคนส์ได้ดีที่สุด และยังมีอีกหลายการศึกษา[19, 20] ที่ทดลองใช้เจลคลอเฮกซิดีนที่ผสมขึ้นเองโดยใช้ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลสเป็นสารก่อเจลเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส

ในต่างประเทศมีผู้ผลิตเจลคลอเฮกซิดีนเพื่อใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟัน มีชื่อการค้าคือ คอนเซปซิสวี (Consepsis®V, Ultradent Product Inc., South Jordan,USA) ความเข้มข้นร้อยละ 2 จากการศึกษาของ Sharifian และคณะ[21] ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบคอนเซปซิสวีกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในคลองรากฟันที่ถูกถอน ผลการศึกษาพบว่าคอนเซปซิสวีสามารถกำจัดเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสดีกว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีผลิตภัณฑ์เจลคลอเฮกซิดีนจำหน่าย มีเพียงการผลิตสารละลายคลอเฮกซิดีน ความเข้มข้นร้อยละ 2 เพื่อใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันเท่านั้น ผู้วิจัยจึง

มีความสนใจที่จะพัฒนาเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ขึ้นที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และทำการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส เปรียบเทียบกับเจลคลอเฮกซิดีคอนเซปซิสวีที่ผลิตจำหน่ายในต่างประเทศและสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2

คำถามงานวิจัย

เจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตที่พัฒนาขึ้นที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒความเข้มข้นร้อยละ 2 เจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตที่จำหน่ายในต่างประเทศความเข้มข้นร้อยละ 2 และสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส แตกต่างกันหรือไม่

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตที่พัฒนาใหม่กับเจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตที่ใช้ในต่างประเทศและสารละลายคลอเฮกซิดีนที่ใช้เป็นยาภายในคลองรากฟัน โดยการใช้วิธีทดสอบการแพร่บนวุ้น

ความสำคัญของการวิจัย

เจลคลอเฮกซีดีนกลูโคเนตมีคุณสมบัติที่ดีในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในคลองรากฟัน โดยเฉพาะในกรณีที่เชื้อดื้อต่อการรักษาเช่นเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่นำมาใช้ในคลองรากฟันยังไม่มีการนำมาใช้และผลิตจำหน่ายในประเทศไทย โดยคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ เป็นหนึ่งในคุณสมบัติที่ควรศึกษาของเจลคลอเฮกซิดีน โดยคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อของเจลคลอเฮกซิดีนควรพิจารณาให้มีความใกล้เคียงกับเจลคลอเฮกซิดีนที่ใช้ในต่างประเทศ การศึกษานี้จึงจะเริ่มต้นศึกษาเพื่อนำไปสู่การพัฒนาและผลิตใช้เจลคลอเฮกซิดีนในประเทศ

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ

ตัวแปรที่ศึกษา

1.ตัวแปรอิสระ ได้แก่

1.1 ชนิดของคลอเฮกซิดีน

1.1.1 เจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่พัฒนาใหม่

1.1.2 เจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ยี่ห้อคอนเซปซิสวี

1.1.3 สารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2

1.2 ระยะเวลาในการทดสอบ

1.2.1 1 วัน

1.2.2 7 วัน

1.2.3 14 วัน

1.2.4 21 วัน

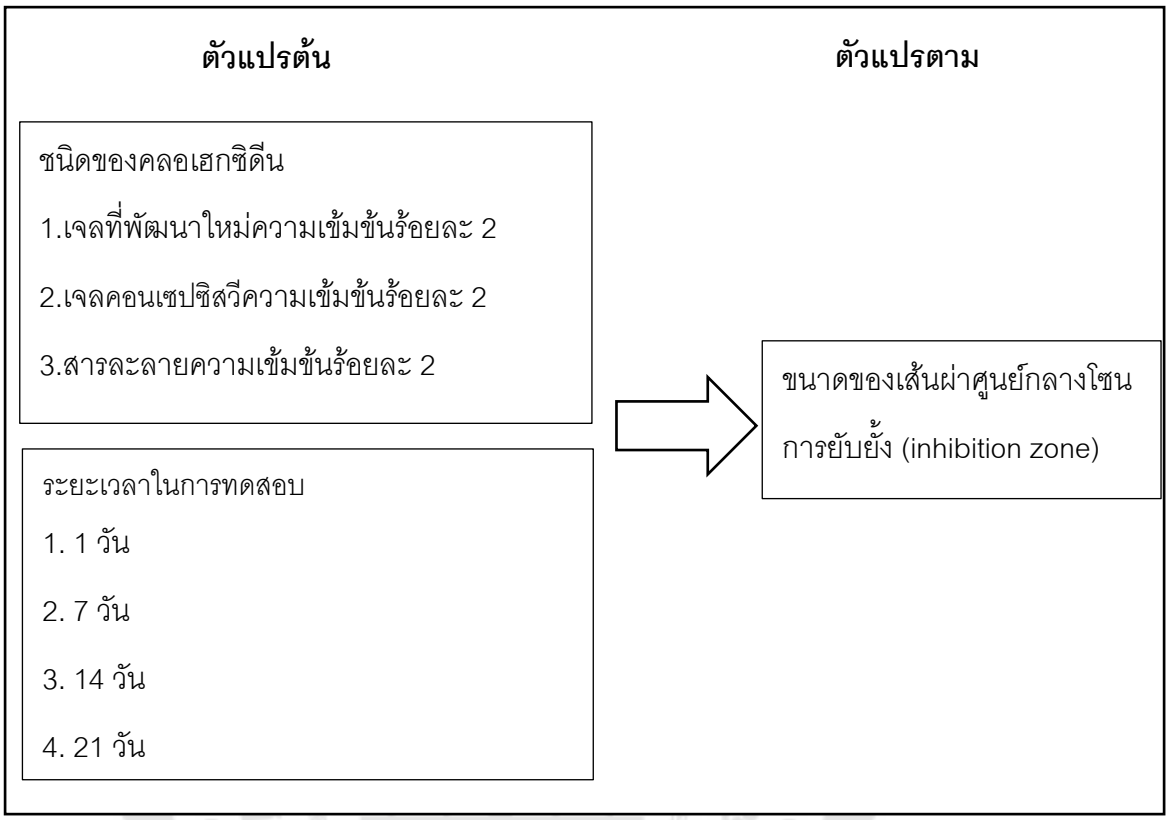
2. ตัวแปรตามได้แก่ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนการยับยั้ง (inhibition zone) บนวุ้นของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. โซนการยับยั้ง (inhibition zone) หมายถึง บริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อ โดยสารทดสอบแสดงให้เห็นเป็นบริเวณที่วุ้นมีความใส บริเวณใสที่มากกว่า 5 มิลลิเมตร ถือว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

2. ค่าความขุ่นของการดูดกลืนแสง (Optical Density) เป็นวิธีการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลลินทรีย์ในอาหารเหลว(broth) เป็นบริเวณที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตแล้วทำให้อาหารขุ่น โดยสารทดสอบที่มีค่าความขุ่นเท่ากับศูนย์ (zero turbidity) คือไม่มีความขุ่น ถือว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ

กรอบแนวคิดในงานวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดวิจัย

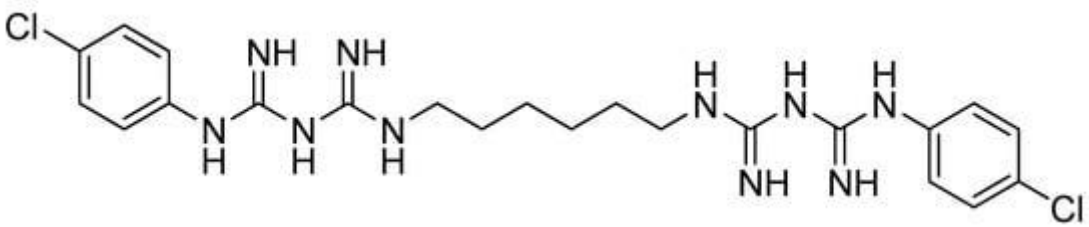
สมมุติฐานในการวิจัย

สมมุติฐานหลัก : เจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่พัฒนาใหม่ เจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตคอนเซปซิสวีและสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ใช้เป็นยาภายในคลองรากฟัน มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสที่เวลา 1 วัน 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน

สมมุติฐานรอง : เจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่พัฒนาใหม่ เจลคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตคอนเซปซิสวีและสารละลายคลอเฮกซิดีนเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ใช้เป็นยาภายในคลองรากฟัน มีประสิทธิภาพแตกต่างกันในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสที่เวลา 1 วัน 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คลอเฮกซิดีนเป็นยาที่ถูกนำมาใช้ในงานรักษาคลองรากฟัน โดยคลอเฮกซิดีนประกอบไปด้วย 4 คลอโรฟีนีลริงที่สมมาตรกัน (symmetric 4-chlorophynyl rings) 2 วง และกลุ่มไบกัวไนด์ (biguanide) 2 กลุ่ม เชื่อมกันด้วยพันธะเซนทรัล เฮกซะเมทีลีน (central hexamethylene chain) มีสูตรทางเคมีคือ $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ [9]



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างโมเลกุลของคลอเฮกซิดีน

กลไกการออกฤทธิ์ของคลอเฮกซิดีน

คลอเฮกซิดีนมีความเป็นเบสสูงและแสดงประจุบวกในสภาวะที่ค่าพีเอชพบภายในเซลล์ส่วนใหญ่ (physiological PH) โดยจะมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.8-8 โดยประจุบวก (cationic) ของคลอเฮกซิดีนนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ของผนังเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียซึ่งเป็นประจุลบ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้เข้าไปเปลี่ยนแปลงสมดุลออสโมซิส (osmotic equilibrium) ของเซลล์ ส่งผลให้โมเลกุลของคลอเฮกซิดีนเข้าสู่แบคทีเรีย โดยคลอเฮกซิดีนที่มีความเข้มข้นต่ำมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacteriostatic effect) เนื่องจากมีผลเฉพาะบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนที่มีความเข้มข้นสูง ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal effect) เพราะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนของเซลล์และมีการตกตะกอนของโปรตีนแบบผันกลับไม่ได้ ส่งผลให้เซลล์ตายผ่านกระบวนการไซโตไลซิส (cytolysis)[15]

คลอเฮกซิดีนมีลักษณะเด่นคือมีคุณสมบัติการคงอยู่ได้นาน (substantivity) เนื่องจากไฮดรอกซิอะพาไทท์ (hydroxyapatite) สามารถดูดซับประจุบวกของคลอเฮกซิดีนเข้าไปในเนื้อฟันและค่อยๆปลดปล่อยคลอเฮกซิดีนออกมาอย่างๆช้า โดยคุณสมบัติการคงอยู่ได้นานของคลอเฮกซิดีนจะแปรผันตามความเข้มข้น[16, 22]

ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียของคลอเฮกซิดีนขึ้นอยู่กับการเกาะติด (adsorption) บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยถ้ามีการเกาะติดมาก จะส่งผลให้เกิดการรั่วของส่วนประกอบในเซลล์ออกไปนอกเซลล์ ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตาย โดยคลอเฮกซิดีนเมื่อใช้เป็นยาที่ใส่ในคลองรากฟันบริเวณเนื้อฟันส่วนรากฟันเป็นระยะเวลา 7 วันพบว่ามีจำนวนเชื้อเอ็นเทอโรคอคคอคคัสฟีคัลลิสบริเวณเนื้อฟันน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากกระบวนการเกาะติดในฟันมนุษย์เกิดได้ช้าในการเกิดปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างชั้นเนื้อฟันและคลอเฮกซิดีน[23, 24]

อย่างไรก็ตามคลอเฮกซิดีนมีข้อจำกัดคือ ไม่มีฤทธิ์ในการละลายเนื้อเยื่อ ไม่มีฤทธิ์ในการกำจัดแผ่นชีวภาพและซากอินทรีย์ จากการศึกษาของ Okino และคณะ[25] ทำการศึกษาความสามารถในการละลายเนื้อเยื่อของไซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1 และ 2 เปรียบเทียบกับสารละลายคลอเฮกซิดีนและเจลคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยใช้น้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าน้ำกลั่นและคลอเฮกซิดีนทั้ง 2 รูปแบบไม่มีความสามารถในการละลายเนื้อเยื่อที่เวลาภายใน 6 ชั่วโมง

รูปแบบของคลอเฮกซิดีนที่นำมาใช้ในงานเอ็นโดดอนติกส์

คลอเฮกซิดีนที่นำมาใช้ในงานเอ็นโดดอนติกส์มีทั้งในรูปแบบที่เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันและยาใส่ในคลองรากฟัน โดยคลอเฮกซิดีนที่ใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันในรูปแบบสารละลาย พบว่าแม้ว่าจะได้ล้างยาที่อยู่ในคลองรากฟันออกไปแล้ว แต่เนื้อฟันสามารถดูดซับประจุบวกของคลอเฮกซิดีนไว้ได้ทำให้เกิดการป้องกันการเกาะกลุ่มของเชื้อบนผนังคลองรากฟัน จากการศึกษาของ Khademi และคณะ[26] ทำการล้างคลองรากฟันด้วยสารละลายคลอเฮกซีดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 นาน 5 นาที ผลการศึกษาพบว่าสารละลายคลอเฮกซิดีนมีความสามารถในการออกฤทธิ์ได้ประมาณ 4 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rosenthal และคณะ[27] พบว่าภายหลังการล้างด้วยสารละลายคลอเฮกซีดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 นาน 10 นาที คลอเฮกซิดีนสามารถคงอยู่ในเนื้อฟันที่ผนังคลองรากฟันในปริมาณที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ถึง 12 สัปดาห์ โดยพบปริมาณคลอเฮกซิดีนในเนื้อฟันหลังการใช้1,3,6,12 สัปดาห์เท่ากับ ร้อยละ 0.0048 0.0023 0.0016 และ 0.0010 ของสารละลายคลอเฮกซิดีนเริ่มต้นตามลำดับ

ในด้านประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส เมื่อใช้คลอเฮกซิดีนเป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน Vianna และคณะ[28] พบว่าคลอเฮกซิดีนในรูปแบบสารละลายที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 และร้อยละ 1 สามารถกำจัดเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสได้ อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 5.25 ในขณะที่รูปแบบเจลมีฤทธิ์กำจัดเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสได้ แต่ใช้เวลา 1 นาที ในการกำจัดเชื้อซึ่งนานกว่าเมื่อเทียบกับรูปแบบ

ของเหลว สำหรับคลอเฮกซิดีนรูปแบบเจลนั้นมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันต่ำและสามารถยึดเกาะกับผนังคลองรากและท่อเนื้อฟันที่ดี โดยออกฤทธิ์จับกับไฮดรอกซิอะพาไทท์ทำให้เจลคลอเฮกซิดีนมีฤทธิ์ที่นานกว่าโซเดียมไฮโปคลอไรต์ โดยเจล คลอเฮกซิดีน มีส่วนประกอบคือสารละลายคลอเฮกซิดีนกลูโคเนตและโพลีเมอร์เจลที่ชื่อว่า นาโทรซอล (natrosol) หรือไฮดรอกซีเอทิล เซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) ความเข้มข้นร้อยละ 1 [29]

ในด้านประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส เมื่อใช้คลอเฮกซิดีนเป็นยาใส่ในคลองรากฟัน Ercan และคณะ[30] ได้ทำการเปรียบเทียบเจลคลอเฮกซิดีน ความเข้มข้นร้อยละ 2 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับคลอเฮกซิดีนและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยมีน้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุมลบ ทำการศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสและเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ เมื่อใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟันดูผลที่ระยะเวลา 7 วัน 15 วัน และ 30 วัน ผลการศึกษานี้พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสและเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์มากกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญในทุกช่วงเวลา

ต่อมาได้มีการนำคลอเฮกซิดีนมาผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยหวังผลความเป็นด่างของแคลเซียมไฮดรอกไซด์จะช่วยให้การกำจัดเชื้อมีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการศึกษาของ Waltimo และคณะ[31]และการศึกษาของ Evanและคณะ[32]พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมกับคลอเฮกซิดีนมากกว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียว

แต่อย่างไรก็ตาม Haenni และคณะ[33]ได้ศึกษาโดยใช้วิธีการทดสอบการแพร่บนวุ้น พบว่าการผสมแคลเซียมไฮดรอกไซด์กับคลอเฮกซิดีนไม่ได้ช่วยให้มีผลต้านต่อเชื้อเพิ่มขึ้นและยังทำให้คลอเฮกซิดีนมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อที่ลดลงด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Gomes และคณะ[13]ได้ทำการศึกษาในห้องทดลองพบว่าเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส ในฟันวัวได้ดีถึง 15 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียว โดยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส และเจลคลอเฮกซิดีนที่ผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถยับยั้งเชื้อได้สมบูรณ์เพียง 2 วัน หลังจากนั้นคุณสมบัติต้านจุลชีพจะลดลงเหลือร้อยละ 66.6 และ 33.3 ในวันที่ 7 และ 15 ตามลำดับ การที่เจลคลอเฮกซิดีนผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในช่วง 2 วันแรก เนื่องจากการมีค่าพีเอชเพิ่มสูงถึง 12.8 ซึ่งโดยปกติคลอเฮกซิดีนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 ส่วนแคลเซียมไฮดรอกไซด์มีค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยเจลคลอเฮกซิดีนมีส่วนประกอบ

ที่เป็นเมทิลเซลลูโลสซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เป็นน้ำ เมื่อผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์จึงทำให้มีระดับพีเอชสูง การที่ฤทธิ์ต้านจุลชีพลดลงในวันที่ 7 และ 15 มาจากการที่แคลเซียมไฮดรอกไซด์มีส่วนลดฤทธิ์ต้านจุลชีพของคลอเฮกซิดีนเพราะเกิดการแย่งจับกันระหว่างประจุบวกของคลอเฮกซิดีนกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในการจับกับประจุลบของฟอสโฟลิปิดของผนังเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย

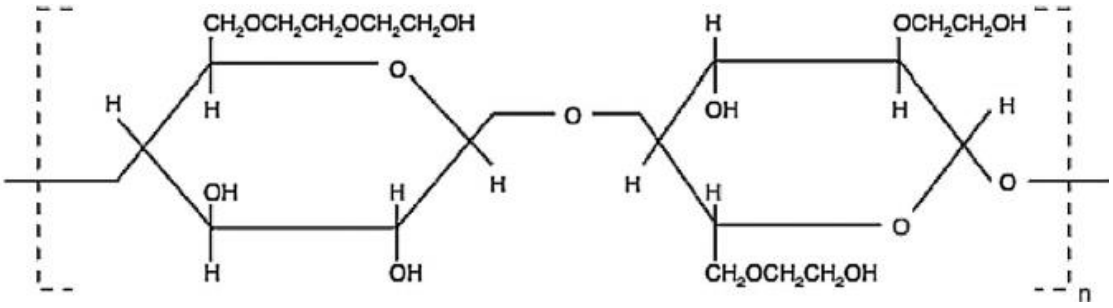
เจลคลอเฮกซิดีน

เจลถูกจำกัดความว่าเป็นสารกึ่งแข็ง (Semi rigid) โดยความแข็งของเจลได้มาจากโครงร่างตาข่ายที่ถูกสร้างจากการเชื่อมต่อกันของสารก่อเจล (gelling agent)[34] ซึ่งเจลถูกนำมาใช้เป็นตัวขนส่งยาหรือสารออกฤทธิ์ (active ingredient) โดยเจลประกอบไปด้วยสารก่อเจล (gelling agents) สารกันเสีย(preservatives) สารคงตัว (stabilizers) อิมัลซิไฟเออร์ emulsifiers และสารออกฤทธิ์ 1 ชนิดหรือมากกว่า[35]

สารก่อเจลแบ่งออกได้เป็น สารก่อเจลที่ได้จากธรรมชาติ สารก่อเจลกึ่งสังเคราะห์ และสารก่อเจลสังเคราะห์ สารก่อเจลที่นิยมนำมาใช้ได้แก่สารก่อเจลประเภทกึ่งสังเคราะห์ที่ได้จากเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivatives) เกิดจากปฏิกิริยาการแทนที่ไฮโดรเจนในหมู่ไฮดรอกซิลทำให้เกิดไฮเดรชันโดยโมเลกุลน้ำได้ง่ายขึ้น ทำให้กลายเป็นอนุพันธ์ที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) และอีเทอริฟิเคชัน(etherification) ทั้งสองปฏิกิริยาจะให้อนุพันธ์ของเซลลูโลสที่มีความสำคัญยิ่งในอุตสาหกรรมเส้นใยสังเคราะห์ พลาสติก วัสดุทางการแพทย์และอื่นๆ ตัวอย่างอนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ได้จากปฏิกิริยาอีเทอริฟิเคชันทำให้ได้อนุพันธ์ที่สำคัญของเซลลูโลส เช่น เมทิลเซลลูโลส (methyl cellulose) เอทิลเซลลูโลส (ethyl cellulose) เบนซิวเซลลูโลส (benzyl cellulose) ไฮดรอกซิเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) ไซยาโนเอทธิลเซลลูโลส (cyanoethyl cellulose) และคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC)[36]

องค์ประกอบของเจลคลอเฮกซิดีนมีส่วนประกอบหลักคือโพลีเมอร์ ซึ่งเป็นสารสร้างเนื้อเจล โดยจะมีโพลีเมอร์ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละสูตรเจลที่ศึกษาได้แก่ ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลสหรือนาโทรซอล ไฮดรอกซีโพพิล เมทิลเซลลูโลส (hydroxypropyl methylcellulose) ไฮดรอกซีโพพิล เซลลูโลส (hydroxypropyl cellulose) และคาบอกซีเมทิล เซลลูโลส[20, 37]

โดยข้อมูลทางเภสัชวิทยาพบว่าไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลสเป็นสารก่อเจลที่สามารถละลายน้ำได้ดีทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น เป็นสารก่อเจลที่ไม่มีประจุ มีความเฉื่อย (inert) เป็นสารที่มีความไวต่อปฏิกิริยาต่ำ และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility)[38]



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส[39]

ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลสสามารถรวมกับสารละลายคลอเฮกซิดีนและมีการก่อตัวกลายเป็นเจลคลอเฮกซิดีนได้ Bem และคณะ[20] ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของคลอเฮกซิดีนเจลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยเปรียบเทียบจากคลอเฮกซิดีนเจลที่ผลิตขึ้นมาจากคลอเฮกซิดีนยี่ห้อยูนิอะลาลาส (Uniararas School of Pharmacy, Araras, Brazil) ที่เริ่มต้นโดยการใช้น้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาผสมกับนาโทรซอลซึ่งเป็นสารสร้างเนื้อเจล แล้วค่อยๆเติมสารละลายคลอเฮกซิดีนและผสมให้เข้ากัน เปรียบเทียบกับสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ผลการศึกษาพบว่ามีผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลาย (degradation product) ที่เกิดขึ้นได้แก่พาราคอโรอะนิลีนและอนุมูลอิสระ(reactive oxygen species) แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายนี้ พบในปริมาณที่น้อยและลดลงเมื่อเวลาผ่านไป โดยเจลที่ผลิตขึ้นมาในทุกกลุ่มทดลองที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ยังต้องมีการพัฒนาวิธีการในการผลิตเพื่อให้เจลมีความเข้ากันได้ (homogenous) มากขึ้น ผลจากการศึกษาครั้งนี้จึงพบว่าการผลิตเจลคลอเฮกซิดีน โดยการให้ความร้อนนาโทรซอลที่อุณหภูมิ 70 องศาแล้วพักให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลายคลอเฮกซิดีน พบว่าสารละลายคลอเฮกซิดีน สามารถทนอุณหภูมิได้และไม่ได้ทำลายองค์ประกอบของคลอเฮกซิดีน

นอกจากนี้ก็ยังมีการศึกษาที่ผลิตเจลคลอเฮกซิดีนขึ้น โดยใช้วิธีที่คล้ายกับที่ได้กล่าวมาแต่ใช้โพลีเมอร์ที่แตกต่างกัน[37] โดยประเมินการปลดปล่อยยาคลอเฮกซิดีนเจลแต่ละสูตรเปรียบเทียบกัน 9 สูตร โดยมีโพลีเมอร์ 3 ชนิดหลักคือไฮดรอกซีโพพิล เมทิลเซลลูโลส (hydroxypropyl methylcellulose) ไฮดรอกซีโพพิล เซลลูโลส (hydroxypropyl cellulose) คาบอกซีเมทิล เซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) ที่ความเข้มข้นต่างกัน ซึ่งมีวิธีผสมเจลคือละลายในน้ำร้อน 65 องศาเซลเซียส แล้วคนให้ละลายให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายคลอเฮกซิดีน จนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 1 จากนั้นปล่อยให้เย็นเป็นเจล และนำไปใช้หลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยผลการศึกษาพบว่าโพลีเมอร์ที่แตกต่างกัน มีผลต่อการปลดปล่อยยาที่แตกต่างกัน จากการศึกษาทั้งสองการศึกษาพบว่ามีการผลิตเจลคลอเฮกซิดีนขึ้นซึ่งมีวิธีในการเตรียมเจลที่คล้ายคลึงกัน โดย

ได้เริ่มต้นจากการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียสเพื่อละลายสารสร้างเนื้อเจล ก่อนที่จะเติมสารละลายคลอเฮกซิดีนลงไปและคนให้มีความเข้ากัน

โพลีเมอร์ที่เป็นส่วนผสมของเจลคลอเฮกซิดีนตามการศึกษาส่วนใหญ่มีไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบ จากการศึกษาของ Dametto และคณะ[40] ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ผลิตจากสารก่อเจลไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส โดยเปรียบเทียบกับสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เมื่อใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีเพียงกลุ่มเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 และสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ไม่พบเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าสารก่อเจลไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลสที่ก่อตัวเป็นเจลคลอเฮกซิดีนยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส

เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส

เอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสเป็นเชื้อที่เจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นในรอยโรคการติดเชื้อทุติยภูมิและการติดเชื้อยืดเยื้อ [41] ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุของการไม่หายของรอยโรค แต่มีสมมุติฐานที่เป็นไปได้ คือเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสเป็นเชื้อกลุ่มแรกที่เข้ามาตั้งถิ่นฐานในฟันที่มีการติดเชื้อในคลองรากฟันและเป็นเชื้อที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นเบสสูง เนื่องจากเชื้อสามารถคงระดับความเป็นกรดเบสในเซลล์ด้วยการนำโปรตอนเข้าเซลล์ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้ค่าพีเอชในเซลล์ต่ำลง[42] นอกจากเชื้อสามารถอยู่ได้ในภาวะเป็นเบสสูงแล้วยังสามารถคงอยู่ในสภาวะที่ขาด[43]

อีกสมมุติฐานเชื่อว่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่เข้ามาภายหลังการรักษาคลองรากฟันแล้ว จากการศึกษาของ Zehnder และคณะ[44] ได้เก็บน้ำลายมนุษย์ทั้งหมด 206 คนมาทดสอบหาเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส ผลการศึกษาพบเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส 45 คน จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสไม่ได้เป็นเชื้อประจำถิ่นและนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสยังสามารถสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ได้ใน 2 วันและเชื้อยังเติบโตได้ ถึงแม้จะมีการใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ในคลองรากฟันเป็นเวลา 86 วัน [45]

วิธีการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อ

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย คือการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อของยา วิธีที่เป็นพื้นฐานเช่นการทดสอบการแพร่บนวุ้นและวิธีที่ใช้แพร่หลายได้แก่ การทดสอบด้วยการ

เจือจาง (broth microdilution) โดยผลการทดสอบที่ได้จะเป็นเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ การทดสอบการต้านเชื้อมีหลายวิธีได้แก่

1.วิธีทดสอบด้วยการแพร่บนวุ้น (Agar diffusion test)

ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาหรือสารทดสอบ โดยการหาบริเวณที่สารทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งจะปรากฏเป็นพื้นที่บนวุ้นที่มีความใสกว่าจุดศูนย์กลางที่มียา ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเรียกว่าโซนการยับยั้ง (inhibition zone) ซึ่งจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยา ข้อดีของวิธีนี้คือ รวดเร็ว แปลผลง่าย ราคาไม่แพง แต่เป็นการแปลผลเชิงคุณภาพ (qualitative) แบบเดียวเท่านั้น บอกได้เพียงว่าเชื้อที่ทดสอบมีความไวต่อยา (susceptible) หรือดื้อยา (resistant) โดยไม่สามารถแปลผลแบบเชิงปริมาณ (quantitative) เช่นไม่สามารถบอกค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration) ได้ [46]

จากการศึกษาของ Basrani และคณะ[16]ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 0.2 ในรูปแบบเจลและสารละลาย กับแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียวและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ผสมกับคลอเฮกซิดีน ในการต้านต่อเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสโดยการเลี้ยงเชื้อบนเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน (Brain Heart Infusion agar) ใส่ยาที่ต้องการทดสอบลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ วัดผลจากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนการยับยั้ง ผลการศึกษาพบว่าคลอเฮกซิดีนทั้งในรูปแบบของเจลและสารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 มีเส้นผ่าศูนย์กลางโซนการยับยั้งมากกว่าคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 อย่างมีนัยสำคัญ โดยกลุ่มแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียวไม่พบเส้นผ่าศูนย์กลางโซนการยับยั้งเลย ผลจากการศึกษาพบว่าการใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียวที่ในคลองรากฟันไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส

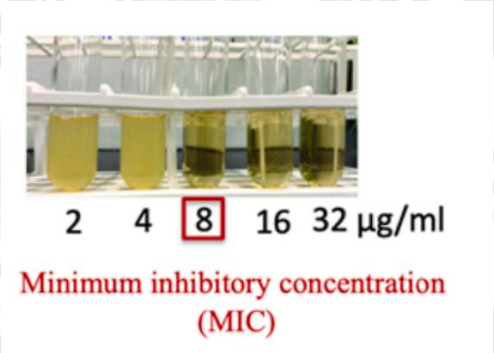
Jorgensen และคณะ[47] ได้ใช้คาลิปเตอร์เพื่อความแม่นยำในการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง เนื่องจากบางวงใสที่เกิดขึ้น มีความกว้างของแต่ละตำแหน่งที่ไม่เท่ากัน Jorgensen และคณะ ได้แนะนำให้วัดตรงบริเวณที่สั้นที่สุดของจุดศูนย์กลางรอบนอก

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการใช้ซอฟแวร์โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวัดค่าโซนการยับยั้ง จากการศึกษาของ Alonso และคณะ[48] พบว่าโปรแกรมแอนไทโบโอแกรมเจ (Antibiogramj, Department of Mathematics and Computer Science of University of La Rioja, Spain) มีความน่าเชื่อถือในการวัดค่าเส้นผ่าศูนย์กลางโซนการยับยั้งมากถึงร้อยละ 87

2. วิธีทดสอบด้วยการเจือจาง (Broth dilution test)

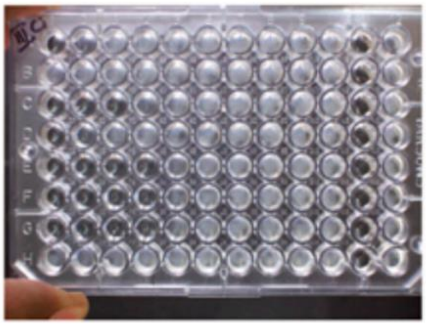
ทดสอบหาความไวของเชื้อต่อยา ในการทดสอบหาความเข้มข้นของยาหรือสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ หลักการโดยทั่วไปคือเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมียาในปริมาณต่างกันผสมอยู่และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ วิธีการนี้แบ่งเป็น macrodilution test และ microdilution test

2.1 Macrodilution test เป็นการทดสอบโดยการเจือจางสารทดสอบลดลงทีละ 2 เท่า ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง จากนั้นใส่เชื้อลงไปในหลอดทดลอง ถ้ายาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก็จะไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อ หากเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตได้จะเกิดความขุ่นของสารในหลอดทดลอง โดยจะอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจากหลอดความเข้มข้นสุดท้ายที่สารในหลอดทดลองยังใสอยู่



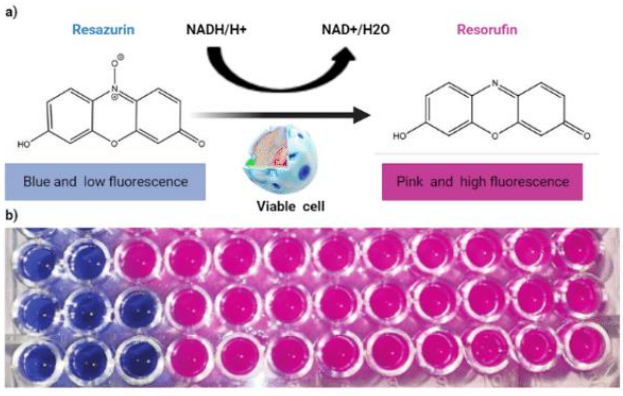
ภาพประกอบ 4 การทดสอบด้วยวิธี Macrodilution test [49]

2.2 Microdilution test เป็นการนำยาหรือสารทดสอบมาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในถาด 96 หลุม จากนั้นใส่เชื้อลงไปในถาดหลุม การทดสอบด้วยวิธีนี้สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้



ภาพประกอบ 5 การทดสอบด้วยวิธี Microdilution test [49]

2.3 การทดสอบด้วยอะลามาร์บลู (Alamar blue) เป็นการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป็นวิธีมาตรฐานตาม สถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and laboratory Standards Institute:CLSI) การอ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยตาเปล่าอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ อะลามาร์บลูเป็นอินดิเคเตอร์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งปกติอะลามาร์บลูจะมีสีน้ำเงินซึ่งอยู่ในรูปรีซาซูริน(resazurin) แต่เมื่อถูกรีดิวซ์จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ซึ่งอยู่ในรูปเรโซรูฟิน (resorufin) ซึ่งสีที่เปลี่ยนเกิดจากการที่เซลล์มีการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึม[50] จึงทำให้วิธีทดสอบดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบอย่างแท้จริง โดยนำมาใช้ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ[51] จากภาพประกอบ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสีอะลามาร์บลู โดยหลุมที่มีสีชมพูแปลผลได้ว่าถึงเชื้อเจริญเติบโตอยู่ และหลุมที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเปลี่ยนสีจะแปลผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ



ภาพประกอบ 6 การเกิดปฏิกิริยาของสารรีซาซูรินทำให้สารเปลี่ยนเป็นสีชมพู[52]

ปัจจัยที่ส่งผลต่อความไวของการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียแบ่งออกเป็นปัจจัยที่สัมพันธ์กับขั้นตอนการทดสอบโดยตรงและปัจจัยที่ไม่สัมพันธ์กับขั้นตอนการทดสอบโดยตรง[53, 54]

ปัจจัยที่สัมพันธ์กับขั้นตอนการทดสอบโดยตรงได้แก่ ส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากระดับความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นประจุบวกจะมีผลต่อการผ่านของยาเข้าผนังเซลล์ จะทำให้เชื้อมีความไวมากกว่าปกติ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการทดสอบยา ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน อาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลว และความหนาของวุ้น (agar) ก็มีผลต่อการแปลผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยความหนามาตรฐานของวุ้น ประมาณ 4 มิลลิเมตร[55] เมื่อทดสอบโดยวิธีการทดสอบการแพร่บนวุ้นที่มีความหนาหรือบางจะทำให้การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแสดงเป็นวงกว้างหรือแคบกว่าปกติ ทำให้แปลผลผิดพลาด

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยในเรื่องอุณหภูมิและบรรยากาศในการบ่ม เนื่องจากบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำ (H_2O) เมื่อน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์รวมกันเกิดเป็นกรด ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร จึงควรบ่มในบรรยากาศที่ไม่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนปัจจัยในเรื่องของเชื้อที่สำคัญคือเรื่องของปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบและระยะเวลาในการบ่ม หากเชื้อมากเกินไปจะส่งผลต่อแบคทีเรียไวต่อยาที่เกินจริงหรือหากปริมาณเชื้อน้อยเกินไปจะทำให้เชื้อแบคทีเรียไวต่อยาที่น้อยเกินจริง และระยะเวลาในการบ่มเชื้อ มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อจุลชีพ โดยเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสควรบ่มอย่างน้อย 24 ชั่วโมง[56]

ปัจจัยที่ไม่สัมพันธ์กับขั้นตอนการทดสอบโดยตรงได้แก่ ประสบการณ์ของผู้ทำการทดสอบ การแปลผลตามค่ามาตรฐาน เป็นต้น

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

จำนวนกลุ่มตัวอย่าง

คำนวณกลุ่มตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม G*power เวอร์ชัน 3.1.9.2 โดยใช้ขนาดของผล (Effect Size) จากงานวิจัยก่อนหน้าที่คล้ายคลึงกันของ Abbaszadegan และคณะ[57]ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ใช้เพลททั้งหมดจำนวน 9 เพลทโดยการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง แบ่งกลุ่มทดลองเป็น 3 กลุ่มและกลุ่มควบคุมลบ

การคัดเลือกเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อที่ใช้คือเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัสลิส อ้างอิงจากการศึกษาของ Lenet และคณะ[25] โดยการเตรียมเลี้ยงเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัส ฟีคัสลิสสายพันธุ์ (Enterococcus faecalis) สายพันธุ์ ATCC29212 จากสหรัฐอเมริกาบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลว (brain heart infusion broth) และทริปติเคสซอยชนิดวุ้น (Trypticase Soy agar) ที่เติมเลือดแกะซึ่งไม่มีส่วนผสมของไฟบริน (defibrinated sheep blood) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตสมบูรณ์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วัสดุและสารเคมีที่ใช้

1.อุปกรณ์

1.1 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

1.2 บีกเกอร์ ขนาด 150, 250 มิลลิลิตร

1.3 ขวดปริมาตร (flask)ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร

1.4 หลอดทดลองและจุกยาง (glass tubes)

1.5 คีมคีบ (forceps)

1.6 ตะแกรงหลอดทดลอง (test tube rack stainless)

1.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (bunsen burner)

1.8 เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล ความละเอียด 0.0001 กรัม (digital balance)

1.9 เครื่องวัดความเป็นกรดและด่าง (pH meter) รุ่น ST3100 F (OHAUS, USA)

1.10 ไม้พันสำลี (swab)

1.11 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

1.12 ปิเปตต์วัดปริมาตร (pipettes)

1.13 ปรอทแก้ววัดอุณหภูมิ (thermometer)

1.14 เครื่องกวนสารละลายแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)

1.15 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)

1.16 ไบออพซีพันช์ (Biopsy punch)

1.17 หลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf) 1.5 มิลลิลิตร

1.18 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer, SHIMADZU, Japan) รุ่น UV-1700

2.สารเคมี

2.1 ผงนาโทรซอลหรือไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (Hydroxyethyl Cellulose) จากบริษัทเคมีภัณฑ์ จำกัด ประเทศไทย

2.2 สารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของแบรนด์ Synguard จากบริษัทอาร์อาร์ คอสเมติกส์ แอนด์ ฟู้ด อินกรีเดียนส์ จำกัด ประเทศไทย

2.3 คลอเฮกซิดีนกลูโคเนตเจลความเข้มข้นร้อยละ 2 คอนเซปซิสวี (ConsepsisV, Ultradent products Inc, South Jordan, UT)

2.4 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate buffer saline)

2.5 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterile distilled water)

2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลว (Brain heart infusion broth)

2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้น (Brain heart infusion agar)

2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อทริปติเคสซอยชนิดวุ้น (Trypticase Soy agar)

2.9 อาหารเลี้ยงเชื้อทริปติเคสซอยชนิดเหลว (Trypticase Soy broth)

2.10 เลือดแกะที่ไม่มีส่วนผสมของไฟบริน (defibrinated sheep blood)

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลว (Brain heart infusion broth)

ชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อหนัก 3.7 กรัมด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ผสมให้ละลายเข้าด้วยกัน วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ค่าในช่วง 7.4 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 5

มิลลิลิตร จำนวน 20 หลอด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเก็บไว้ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้น (Brain heart infusion agar)

ชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อหนัก 5.2 กรัมด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ผสมให้ละลายด้วยเครื่องกวนสารละลายแม่เหล็กเพื่อให้ละลายหมด วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่องวัดค่าพีเอช ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ค่าในช่วง 7.4 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-55 องศา ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 มิลลิลิตรถ่ายลงสู่จานเพาะเชื้อให้วุ้นมีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว จากนั้นนำเก็บไว้ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อทริปติเคสซอยชนิดวุ้น (Trypticase Soy agar)

ชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อหนัก 4.5 กรัมด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ผสมให้ละลายด้วยเครื่องกวนสารละลายแม่เหล็กเพื่อให้ละลายหมด วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่องวัดค่าพีเอช ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ค่าในช่วง 7.3 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาทีนำอาหารที่ชั่งได้ใส่ลงในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เติมเลือดแกะที่ไม่มีส่วนผสมของไฟบรินลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทริปติเคสซอยชนิดวุ้น เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตสมบูรณ์ เขย่า แล้วทำการเทลงบนจานที่ปราศจากเชื้อจานละ 20 มิลลิลิตร (20%) รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว จากนั้นนำไปเก็บไว้ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อทริปติเคสซอยชนิดเหลว (Trypticase Soy broth)

ชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อหนัก 3 กรัมด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ผสมให้ละลายด้วยเครื่องกวนสารละลายแม่เหล็ก

เพื่อให้ละลายหมด วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่องวัดค่าพีเอช ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ค่าในช่วง 7.3 ± 0.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก นำอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกลีเซอรีนเพื่อที่จะให้เชื้อคงสภาพได้ดี แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 20 หลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเก็บไว้ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียมเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

อ้างอิงวิธีการเตรียมเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยดัดแปลงจากของ Bem และคณะ[20] โดยชั่งผงนาโทรซอลหรือไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส ปริมาณ 1 กรัม และน้ำกลั่น 99 กรัมด้วยเครื่องชั่งดิจิตอลความละเอียด 0.0001 กรัม จากนั้นใส่น้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนน้ำมีอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ด้วยการใช้ไมโครเวฟ วัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ชนิดแท่งแก้ว เทผงนาโทรซอลทีละน้อยลงในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ ใช้เครื่องกวนสารละลายแม่เหล็กร่วมกับแท่งแม่เหล็กกวนสารให้กระจายตัวไปทั่วบีกเกอร์และดูการจับกลุ่มกันของเนื้อเจล คนอย่างต่อเนื่องจนเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อสารขึ้นรูปเป็นเนื้อเจลจะได้เจลที่มีปริมาณรวม 100 กรัม พักให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเจลที่เตรียมไว้ 90 กรัมมาเติมสารละลายคลอเฮกซิดีน ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ปริมาณ 10 กรัม เพื่อให้ได้คลอเฮกซิดีนเจลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

การทดสอบการต้านเชื้อของสารคลอเฮกซิดีนต่อเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสด้วยวิธีการทดสอบการแพร่บนวุ้น[16, 58] (Disk diffusion)

การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

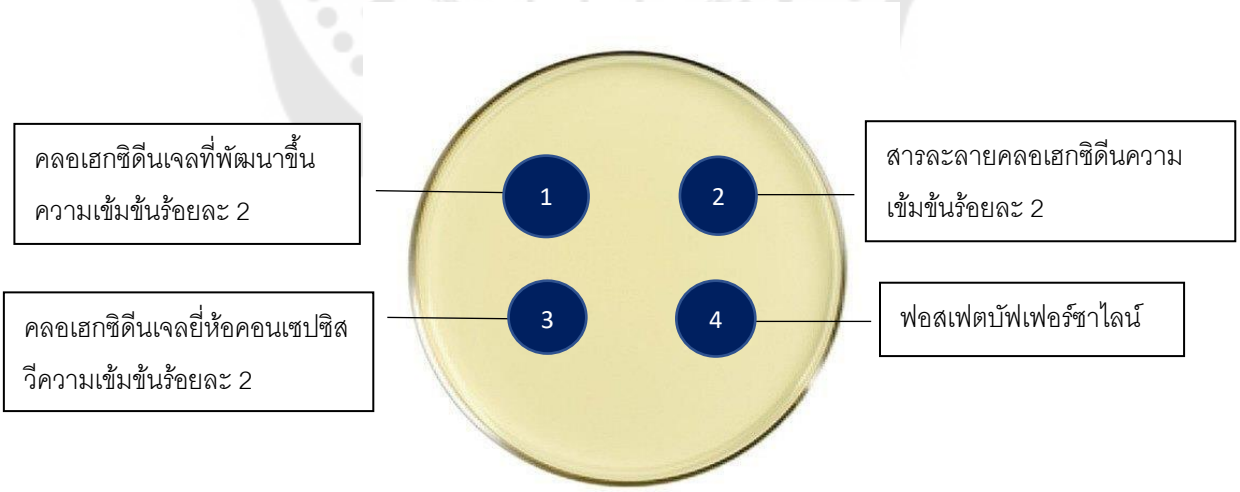
1) เตรียมเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนการทดสอบสาร (overnight culture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) ปรับปริมาณเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส โดยวัดค่าดูดกลืนแสงหรือออพติคอลเดนซิตี (optical density,OD) ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 แมคฟาแลนด์ (Mcfarland) ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อ $1.5x10^8$ โคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโต

มิเตอร์ (spectrophotometer, SHIMADZU, Japan) รุ่น UV-1700 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

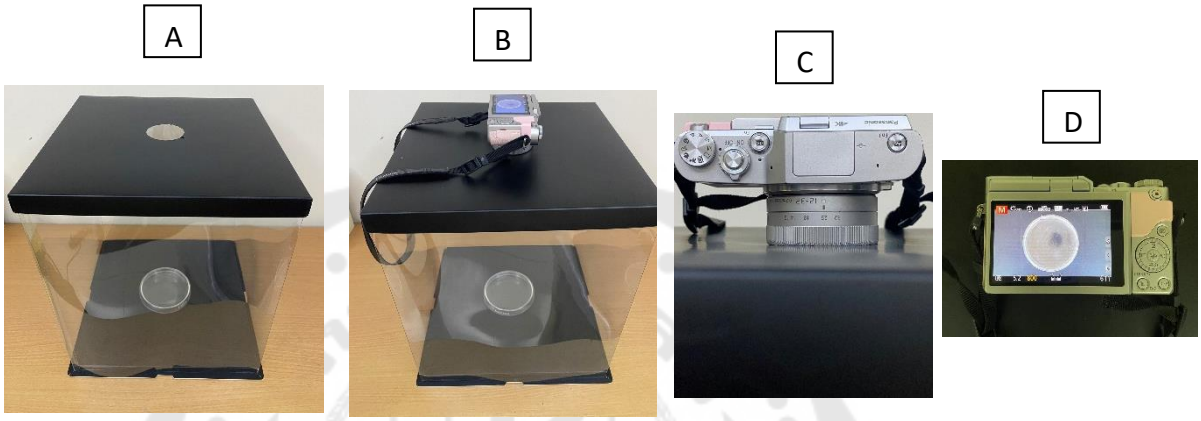
การทดสอบการแพร่บนวุ้น

นำเชื้อที่เตรียมไว้มากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้นให้ทั่วผิวหน้าเพลต โดยใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อ ทำการเจาะหลุมบนวุ้นด้วยไบออพซีพันช์ (Biopsy punch) ที่ปลายเป็นวงกลมโลหะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จำนวน 4 หลุม โดยมีระยะห่างเท่ากัน เริ่มทำการทดลองรอบที่ 1 จำนวน 3 เพลต ใส่ยาลงในแต่ละหลุมปริมาตรเท่ากับ 40 ไมโครลิตร ตามลำดับคือ หลุมที่ 1 เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นความเข้มข้นร้อยละ 2 หลุมที่ 2 สารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 หลุมที่ 3 เจลคลอเฮกซิดีนเจลคอนเซปซิสวีความเข้มข้นร้อยละ 2 หลุมที่ 4 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate buffer saline) เป็นกลุ่มควบคุมลบ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้ง 3 เพลต บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 1 วัน นำจานเพาะเชื้อทั้ง 3 เพลตมาทำการบันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนการยับยั้งในหน่วยมิลลิเมตรด้วยโปรแกรม antibiogramj จากนั้นนำจานเพาะเชื้อกลับเข้าเก็บในตู้บ่มเชื้อต่อจนครบระยะเวลาที่กำหนด คือ 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน จึงนำจานเพาะเชื้อมาวัดผลซ้ำด้วยวิธีเดิม โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 รอบ ในแต่ละรอบทำ 3 เพลต



ภาพประกอบ 7 การเตรียมจานเพาะเชื้อเพื่อทดสอบด้วยวิธีแพร่บนวุ้น

การถ่ายภาพเพลตเพื่อให้สามารถถ่ายภาพซ้ำได้ในตำแหน่งเดิมทุกครั้ง ได้มีการประดิษฐ์เครื่องมือตามภาพประกอบที่ 8 เพื่อให้มีการวางเพลตตำแหน่งเดิมและกล้องตำแหน่งเดิมก่อนที่จะนำเข้าสู่โปรแกรมแอนไทโบโอแกรมเจและอ่านค่าเป็นหน่วยมิลลิเมตร โดยมีการประเมินความเที่ยงภายในตัวผู้ประเมิน (Intra class Correlation Coefficient) จากการนำกลุ่มตัวอย่าง 5 ชิ้น อ่านผลจากโปรแกรมแอนไทโบโอแกรมเจห่างกัน 1 สัปดาห์ เป็นจำนวน 2 ครั้ง



ภาพประกอบ 8 ภาพ A แสดงอุปกรณ์ที่มีการเจาะรูขนาดเท่ากับเลนส์กล้องและขีดเส้นวงกลมให้เพลทวางตำแหน่งเดิม ภาพ B แสดงการวางเพลทและวางกล้องถ่ายรูป ภาพ C แสดงการวางกล้องให้แนบกับอุปกรณ์ ภาพ D ภาพตัวอย่างที่ได้หลังการถ่ายรูป

ภาพประกอบ 9 การเกิดโซนการยับยั้ง

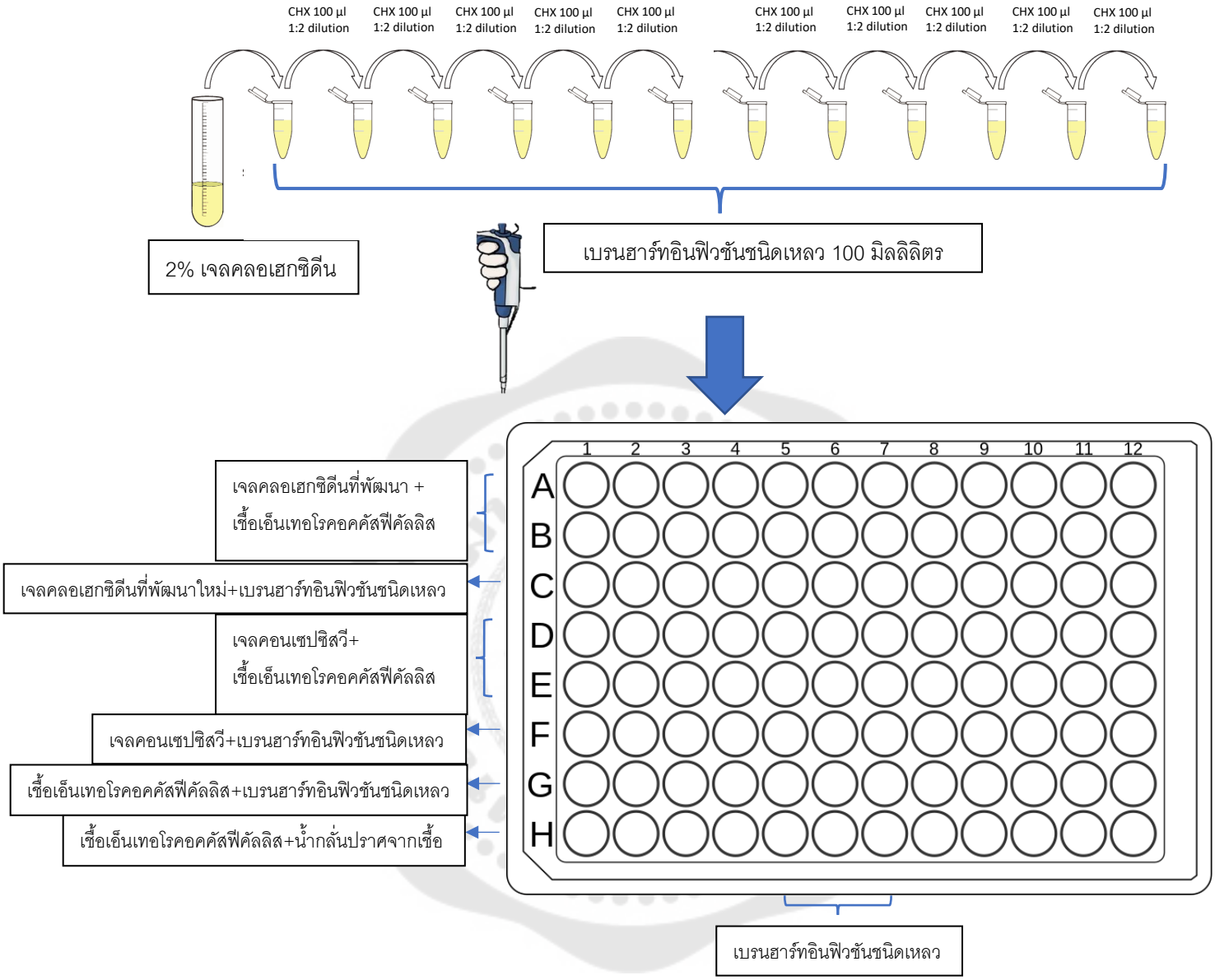
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration;MIC)

การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

เตรียมเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสทิ้งไว้ข้ามคืนในอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับปริมาณเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส โดยวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer UV-1700, Shimadzu Corporation,Japan) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 แมคฟาแลนด์ ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อ $1.5x10^8$ โคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดจาก stock solution โดยการนำเจลคลอเฮกซิดีนที่ผลิตขึ้นร้อยละ 2 และเจลคลอเฮกซิดีนยี่ห้อคอนเซปซิสวีความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำการเจือจางสารสกัดแบบลำดับสอง (two fold serial dilution) โดยการละลายกับอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf) จนได้ความเข้มข้นทั้งหมด 12 ความเข้มข้นทำการทดลอง 3 กลุ่มคือ กลุ่มทดลองที่เป็นเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น กลุ่มควบคุมบวกคือเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี และมีกลุ่มควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำกลั่น



ภาพประกอบที่ 10 การทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แถว A B C เป็นกลุ่มคลอเฮกซิดีนเจลที่พัฒนาขึ้น แถว D E F เป็นกลุ่มคลอเฮกซิดีนเจลคอนเซปซิสวี แถว G H เป็นกลุ่มควบคุมลบที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำกลั่นตามลำดับ

1) ปิเปตสารละลายทั้ง 3 กลุ่มลงไปในถาดหลุมไมโครเพลทปลอดเชื้อ 96 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยกลุ่มที่ 1 คือเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาลงในหลุม A B C กลุ่มควบคุมบวกคือเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวีลงในหลุม D E F และมีกลุ่มควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและน้ำกลั่นลงในหลุม G H(1-3)

2) ปิเปตเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสที่เตรียมไว้ลงไปในถาดหลุมในแถว A B D E G H หลุมละ 50 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีผลทำให้ปริมาตรสุดท้ายของแต่ละหลุมเป็น 100 ไมโครลิตร

3) ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อให้เป็นกลุ่มควบคุมลงไปในถาดหลุมในแถว C F H(1-3) หลุมละ 50 ไมโครลิตร และหลุม H(5-7) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีผลทำให้ปริมาตรสุดท้ายของแต่ละหลุมเป็น 100 ไมโครลิตร

4) ภายหลังการปิเปตจนสารทั้งหมดในทุกหลุมมีปริมาตร 100 ไมโครลิตร จึงได้นำความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.5 % มาเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในการหาค่า MIC ซึ่งความเข้มข้นที่ 0.5% จะอยู่หลุมทางซ้ายสุด และหลุมถัดมาทางด้านขวาจะมีความเข้มข้นของเจลคลอเฮกซิดีนลดลงทีละเท่าตัวของหลุมด้านซ้ายจนได้เป็นเจลคลอเฮกซิดีนทั้งหมด 12 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.0625%, 0.03125%, 0.0156%, 0.0078%, 0.0039%, 0.0019%, 0.0009%, 0.0004%, 0.0002% เรียงจากหลุมด้านซ้ายไปขวา ตามลำดับ

5) ปิดฝาหลุมไมโครเพลทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

6) เมื่อครบกำหนด 24 ชั่วโมง ดูการตกตะกอนด้วยตาเปล่าแล้วบันทึกผล โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสซึ่งจะมีเพียงเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลวเพียงอย่างเดียวและกลุ่มที่เติมเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสร่วมกับเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลวและกลุ่มที่เติมเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสร่วมกับน้ำกลั่น

แปลผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อคือ หลุมทดสอบนั้นจะเห็นเป็นหลุมสุดท้ายที่มีสีใส ในขณะที่หลุมที่มีเชื้อจะพบการตกตะกอน เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

7) หยดสารละลายสีอะลามาร์บลูปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไปในถาดหลุมไมโครเพลท จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยสารอะลามาร์บลูเป็นสารสีม่วงน้ำเงิน มีคุณสมบัติเปลี่ยนเป็นสีชมพูเมื่อทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นหลุมที่มีการเปลี่ยนสีของสารอะลามาร์บลูบ่งบอกถึงมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสซึ่งจะมีเพียงเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลวเพียงอย่างเดียวและกลุ่มที่เติมเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสร่วมกับเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดเหลวและกลุ่มที่เติมเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสร่วมกับน้ำกลั่น

แปลผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อคือหลุมทดสอบนั้นจะเห็นเป็นหลุมสุดท้ายที่มีสีม่วงน้ำเงิน ในขณะที่หลุมที่มีเชื้อจะมีสีชมพูเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ(Minimum Bactericidal Concentration;MBC)

ดูดสารทดสอบทุกหลุมที่ไม่เปลี่ยนสีของอะลามาร์บลูหรือไม่มีการตกตะกอนจากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมา 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้น แล้วกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้นให้ทั่วเพลตโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง หากเจลคลอเฮกซิดีนไม่สามารถฆ่าเชื้อได้จะพบการเจริญเติบโตของเชื้อตามรอยที่กระจายเชื้อลงไปเกิดลักษณะขุ่นขาวบนจานเพาะเชื้อ แต่หากเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นที่ฆ่าเชื้อได้จะไม่พบการเจริญของเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะใส บันทึกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อได้ โดยในการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ ได้ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ในแต่ละสาร

การวิเคราะห์ผล

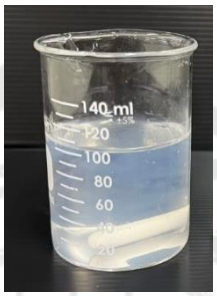
วัดความน่าเชื่อถือภายในผู้ประเมิน โดยใช้สถิติสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในชั้น (Intra class Correlation Coefficient; ICC) ซึ่งวัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งเป็นจำนวน 2 ครั้ง วัดห่างกันเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยผู้วิจัยเพียงคนเดียว

วิเคราะห์ทางสถิติโดยการใช้โปรแกรม SPSS ทดสอบการกระจายข้อมูลด้วยการทดสอบแชฟิโรวิลค์ (Shapiro-Wilk test) เมื่อข้อมูลมีการกระจายตัวปกติ การวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าโซนการยับยั้งระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกันใช้สถิติความแปรปรวนสองทางแบบวัดซ้ำ (Two-way repeated measure ANOVA) และเมื่อเปรียบเทียบยาในกลุ่มเดียวกันระหว่างช่วงเวลาใช้สถิติความแปรปรวนทางเดียวแบบวัดซ้ำ (One-way repeated measure ANOVA) เมื่อข้อมูลมีความแตกต่างอย่างน้อยหนึ่งคู่ จึงทดสอบความแตกต่างรายคู่ด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยการทดสอบดันน์-ซีแดค (Dunn-Sidak test) แต่หากข้อมูลมีการกระจายตัวไม่ปกติเปรียบการวิเคราะห์ผลระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาเดียวกัน ใช้สถิติครัสคาลและวัลลิส (Kruskal Wallis test) และเมื่อเปรียบเทียบยาในกลุ่มเดียวกันระหว่างช่วงเวลา ใช้สถิติฟรีดแมน (Friedman test) คำนวนที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

บทที่ 4
ผลการดำเนินการวิจัย

การเตรียมเจลคลอเฮกซิดีน

การเตรียมเจลคลอเฮกซิดีนให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยใช้ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลสเป็นสารก่อเจล สารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และน้ำกลั่นเป็นวัฏภาคน้ำได้ตำรับที่มีลักษณะเป็นเจลใส ไม่แยกชั้น ดังแสดงในภาพที่ 11



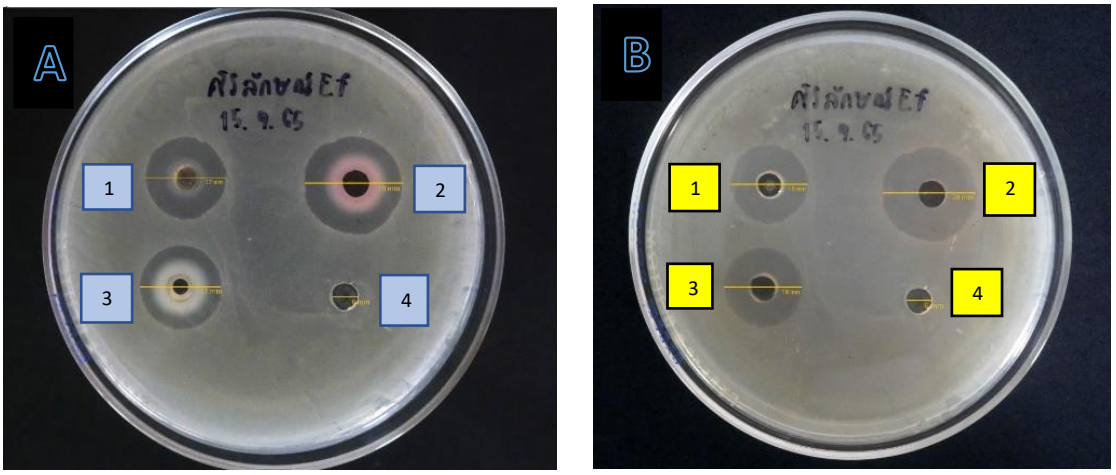
ภาพประกอบที่ 11 ลักษณะของเจลคลอเฮกซิดีนภายหลังการผสมแล้ว

การทดสอบประสิทธิภาพของเจลคลอเฮกซิดีนในการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสด้วยวิธีการทดสอบการแพร่บนวุ้น

ผลการวัดความน่าเชื่อถือภายในผู้ประเมินพบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในชั้นของการวัดค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งมีค่า 0.867 แสดงความน่าเชื่อถือของผู้ประเมินอยู่ในระดับดี

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูลด้วยสถิติแชฟิโรวิลค์พบว่ามีการกระจายตัวของข้อมูลปกติ (Normal distribution) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสด้วยการทดสอบการแพร่บนวุ้นโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง แสดงดังภาพที่ 12 และตารางที่ 1



ภาพประกอบที่ 12 การลากเส้นเพื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสด้วยโปรแกรมแอนไทโบโอแกรมเจ เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน (ภาพ A) และ 21 วัน (ภาพ B) โดย 1 คือเจลคลอเฮกซิดีนเจลที่พัฒนาขึ้น 2 คือสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ2 3 คือเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี และ 4 คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์

ตาราง 1 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสในหน่วยมิลลิเมตร (mean ±SD)

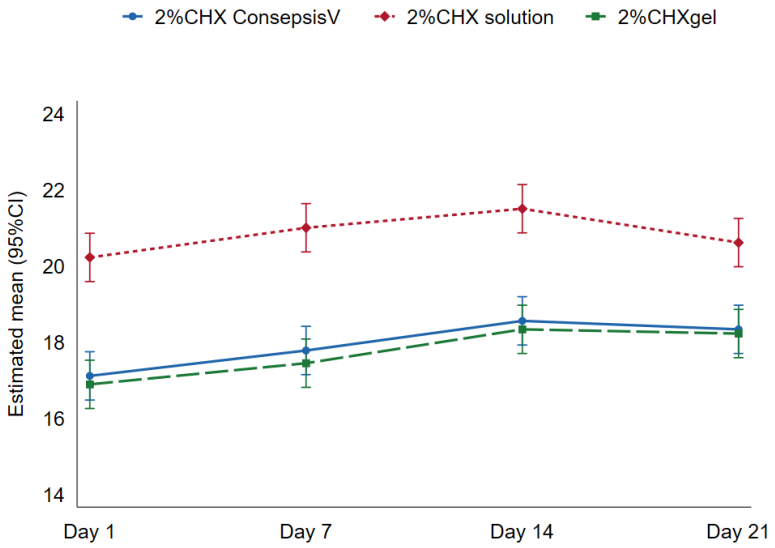
ระยะเวลา	เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น	เจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี	สารละลายคลอเฮกซิดีน
1 วัน	16.8 ± 0.60 ^{a,A}	17.1 ± 0.85 ^{a,A}	20.2 ± 1.5 ^{b,A}
7 วัน	17.4 ± 0.63 ^{a,A}	17.7 ± 0.66 ^{a,A}	21.0 ± 1.1 ^{b,B}
14 วัน	18.3 ± 0.75 ^{a}	18.5 ± 0.75 ^{a}	21.5 ± 1.2 ^{b}
21 วัน	18.2 ± 0.75 ^{a,B}	18.3 ± 0.61 ^{a,B}	20.6 ± 1.1 ^{b,A}

ในแถวเดียวกัน a,b ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ในคอลัมน์เดียวกันเมื่อเทียบกับระยะเวลา 14 วัน ตัวอักษร A แสดงถึงมีความแตกต่างกับระยะเวลา 14 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตัวอักษร B แสดงถึงมีความแตกต่างกับระยะเวลา 14 วันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัสลิสระหว่างสารทดสอบ 3 ชนิดที่ 4 ช่วงเวลาคือ 1, 7, 14 และ 21 วัน โดยวิเคราะห์ทางสถิติความแปรปรวนสองทางแบบวัดซ้ำ พบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวีมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งน้อยกว่าสารละลายคลอเฮกซิดีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในทั้ง 4 ช่วงเวลาที่ศึกษา

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัสลิสระหว่างช่วงเวลาที่ต่างกันคือ 1, 7, 14 และ 21 วัน ของสารทดสอบแต่ละชนิด โดยการวิเคราะห์ทางสถิติความแปรปรวนทางเดียวแบบวัดซ้ำ พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวีที่ระยะเวลา 14 วันมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 และ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และที่ระยะเวลา 21 วัน เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคอนเซปซิสวีมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งแตกต่างกับวันที่ 14 อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่สารละลายคลอเฮกซิดีนที่ระยะเวลา 21 วันมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งลดลงจากวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากภาพที่ 13 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งของสารทั้ง 3 ชนิด



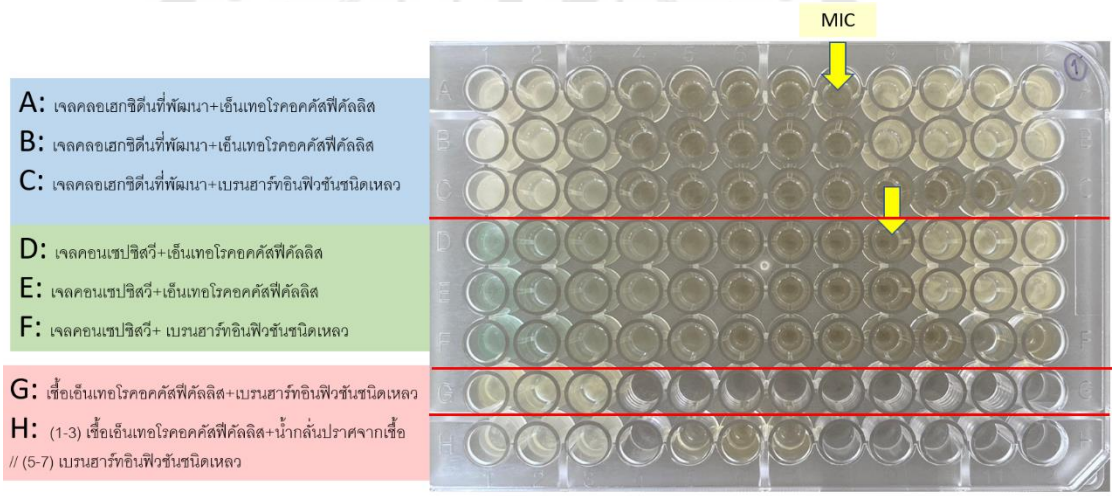
ภาพประกอบที่ 13 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น เจล คลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี และสารละลายคลอเฮกซิดีนที่ระยะเวลาต่างๆ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีน

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวีแตกต่างกัน แต่สารทั้ง 2 ชนิดมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการฆ่าเชื้อเท่ากัน

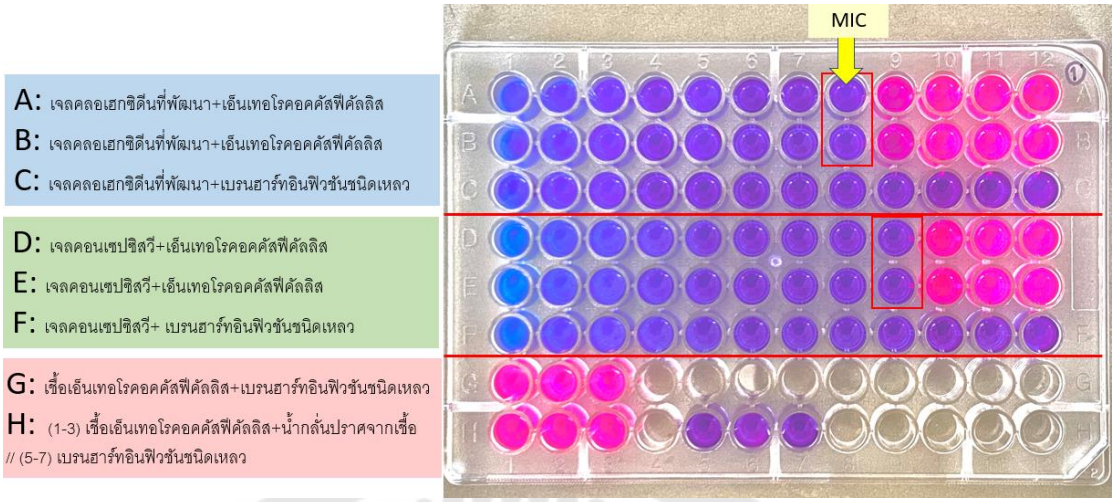
โดยเจลคอนเซปซิสวีมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเท่ากับ 19 และ 312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อคือ 39 และ 312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากภาพประกอบ 14 แสดงเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคอนเซปซิสวีที่ความเข้มข้นสูงมีการตกตะกอนของเจลและเมื่อมีการเจือจางจะพบสารละลายใสขึ้น โดยสารละลายใสหลุมสุดท้ายอ่านเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (ลูกศรสีเหลือง)

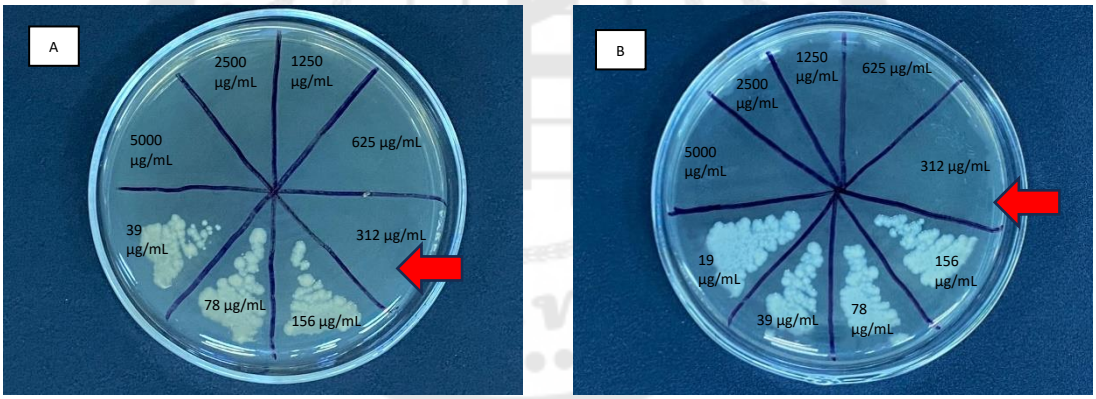


ภาพประกอบ 14 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนและเจลคอนเซปซิสวีโดยดูการตกตะกอนด้วยตา

เมื่อทำการหยดด้วยอะลามาร์บลูพบว่ามีความสอดคล้องกับการดูด้วยตาเปล่าที่ดูการตกตะกอน จากภาพประกอบ 15 แสดงเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคอนเซปซิสวีมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 39 และ 19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ



ภาพประกอบที่ 15 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีนและเจลคอนเซปซิสวีโดยการใช้อะลามาร์บลู



ภาพประกอบที่ 16 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส ภาพ A เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเท่ากับ 312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภาพ B เจลคอนเซปซิสวีมีความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเท่ากับ 312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ลูกศรสีแดงแสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุด)

ตาราง 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ

สารทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (µg/mL)	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (µg/ml)
เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น	39	312
เจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี	19	312

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ลักษณะโดยทั่วไปของเจลคลอเฮกซิดีน

เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนามีความคงตัวทางกายภาพ คือ มีลักษณะเป็นเจลใส ไม่แยกชั้น มีความละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน มีความหนืดที่เหมาะสม สามารถไหลแผ่ออกมาจากปลายเข็มที่ใช้สำหรับการนำยาเข้าสู่คลองรากฟันได้สะดวกและไหลแผ่ออกมาจากปิเปตที่ตัดปลายออกมาได้ ผลการทดลองที่ได้นำไปสู่การอ้างอิงผลลัพธ์ที่สามารถใช้ในทันตกรรมต่อไป

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส โดยการทดสอบการแพร่บนวุ้น

เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสและมีความคงตัวของประสิทธิภาพในการต้านเชื้อไม่แตกต่างกับเจลคอนเซปซิสวีทุกช่วงเวลา ในขณะที่สารละลายคลอเฮกซิดีนมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสลดลงจากวันที่ 14 ไปวันที่ 21

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของเจลคลอเฮกซิดีน

เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสมากกว่าเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี ในขณะที่เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสได้เท่ากับเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี

การอภิปรายผล

เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสเป็นหนึ่งในเชื้อสำคัญที่เป็นสาเหตุของความล้มเหลวภายหลังการรักษาคลองรากฟัน[59] สารที่สามารถต้านเชื้อนี้ได้ดีคือ คลอเฮกซิดีน ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์โดยประจุบวกของโมเลกุลคลอเฮกซิดีนจะจับกับผนังเด็นทินของคลองรากฟันและแทรกเข้าสู่ท่อเนื้อฟันทำให้แบคทีเรียไม่สามารถคงอยู่และเพิ่มจำนวนบนผนังคลองรากฟันได้ จึงมีประสิทธิภาพการต้านเชื้อสูงและกว้าง (broad spectrum)[60] แต่การที่สารอยู่ในรูปแบบสารละลายไม่สะดวกต่อการใช้งานเป็นยาสำหรับใส่ในคลองรากฟัน เนื่องจากยากต่อการควบคุมปริมาณยาและการจำกัดบริเวณของยาอยู่ให้เฉพาะภายในคลองรากฟัน ปัจจุบันจึงมีบริษัทใน

ต่างประเทศผลิตเจลคลอเฮกซิดีนแบบผสมสำเร็จรูปออกจำหน่ายหลายชนิด แต่ละชนิดใช้สารก่อเจลที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพการต้านเชื้อของเจล การศึกษานี้เลือกใช้ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลสหรือนาโทรซอล เนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีประจุ มีความไวต่อปฏิกิริยาต่ำ สามารถละลายน้ำได้ดี ละลายได้ทั้งน้ำร้อนและน้ำเย็น ไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ[38] เจลคลอเฮกซิดีนที่ผสมขึ้นมีความหนืดที่เหมาะสม มีความละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน สามารถไหลแผ่ออกมาจากปลายเข็มที่ใช้สำหรับการนำยาเข้าสู่คลองรากฟันได้สะดวก นอกจากนี้ได้ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของเจลด้วยเครื่องยูวีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่ผสมขึ้นมีสัดส่วนการดูดกลืนแสงเท่ากันอย่างสม่ำเสมอโดยตลอดเนื้อเจล[20] แสดงว่าเจลมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenous) ข้อพิจารณาอีกประการหนึ่งสำหรับการเลือกใช้นาโทรซอลเป็นสารก่อเจลในการศึกษาครั้งนี้คือ นาโทรซอลเป็นสารที่ไม่ส่งผลลบต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัสลิส จากการศึกษาของ Silva และคณะ[19]ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัสลิสของเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับเจลด็อกซีไซคลินไฮโดรคลอไรด์ (Doxycycline hydrochloride) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ที่ผลิตจากสารก่อเจลนาโทรซอล โดยทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัสลิสในฟันที่ถูกถอน ด้วยวิธีการนับจำนวนโคโลนีฟอร์มมิงยูนิตจากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลา 7 วันหลังจากการใส่ยาในคลองรากฟันแล้ว 14 วัน ผลการศึกษาพบว่าเจลคลอเฮกซิดีนมีจำนวนเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัสลิสลดลงมากกว่าเจลด็อกซีไซคลินไฮโดรคลอไรด์แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการใช้นาโทรซอลเป็นสารก่อเจลของคลอเฮกซิดีนเมื่อใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟันไม่มีผลลดประสิทธิภาพในการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัสลิส

เนื่องจากวิธีการทดสอบการแพร่บนวุ้นเป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสในอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้น ซึ่งประกอบไปด้วย calf brain infusion, beef heart infusion, โปรตีโอส เพปโทน (proteose peptone), เด็กซ์โตรส (dextrose), ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate), โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride), น้ำที่ผ่านขบวนการขจัดอิออนของสารละลายทั้งหมด (deionized water) และวุ้น (agar) ส่วนประกอบทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้นที่กล่าวมาเป็นสารที่มีขั้ว ซึ่งคลอเฮกซิดีนเป็นสารที่มีขั้วและละลายน้ำได้ จึงละลายผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้นได้ดี จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้นในการทดสอบการแพร่บนวุ้นของคลอเฮกซิดีน

การศึกษาด้วยวิธีการแพร่บนวุ้น มีข้อจำกัดของวิธีการศึกษาบางประการ การวัดผลการศึกษาด้วยการประเมินเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งสามารถบอกได้ถึงศักยภาพ

(potential) ของสารที่แพร่ในวุ้นไปสัมผัสกับเชื้อ จึงมีปัจจัยที่มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง 3 ปัจจัย ปัจจัยที่หนึ่งคือประสิทธิภาพของสารในการต้านเชื้อ ปัจจัยที่สองคือความเข้มข้นของสารทดสอบ โดยในสารชนิดเดียวกัน ถ้าความเข้มข้นสูงขึ้นมักมีแนวโน้มให้โซนการยับยั้งที่กว้างกว่า ปัจจัยที่สามคือมวลโมเลกุลของสารแต่ละชนิด สารที่มีมวลโมเลกุลมากมักมีอัตราการแพร่ของสารช้ากว่าสารที่มีมวลโมเลกุลที่เล็กกว่า[61] โดยเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวีมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งที่น้อยกว่าสารละลายคลอเฮกซิดีน เนื่องจากมวลโมเลกุลของสารที่อยู่ในรูปแบบเจล ทั้งเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวีมีมวลโมเลกุลของเจลที่มากกว่ามวลโมเลกุลของสารละลายคลอเฮกซิดีน จึงมีอัตราการแพร่ของสารในเจลได้ช้ากว่า

สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Basrani[16] พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งน้อยกว่าสารละลายคลอเฮกซิดีน ความเข้มข้นร้อยละ 2 แต่ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Davis และคณะ[61] ที่พบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อการแพร่บนวุ้น ได้แก่ ความหนาของวุ้นบนจานเพาะเชื้อ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณการเทวุ้นไม่เหมาะสมหรือเทเอียง ทำให้บริเวณที่มีความหนาของวุ้นมากจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนของการยับยั้งน้อยกว่าบริเวณที่มีความหนาของวุ้นน้อยกว่า อุณหภูมิของตู้บ่มเชื้อ และองค์ประกอบทางเคมีรวมถึงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการควบคุมปัจจัยดังกล่าวโดยการทดสอบสารทั้ง 4 ชนิดในจานเพาะเชื้อเดียวกันและทำซ้ำ 3 รอบ

ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าคลอเฮกซิดีนทั้ง 3 ชนิดทำให้เกิดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งขึ้นในขณะที่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมลบไม่เกิดโซนการยับยั้ง เป็นการยืนยันความถูกต้องวิธีและขั้นตอนของการศึกษาและยืนยันว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส

การศึกษาครั้งนี้ศึกษาที่ระยะเวลา 1 7 14 วัน และ 21 วัน การศึกษาผลที่ระยะเวลา 1 วัน เนื่องจากการเจริญของเชื้อจะเริ่มเห็นชัดเจนภายหลังการบ่มที่ 24 ชั่วโมง โดยผลของสารก็เริ่มมีผลต่อการเจริญของเชื้อตั้งแต่ใส่สารลงบนวุ้นทันที และการศึกษาผลที่ระยะเวลา 7 วัน เนื่องจากประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียของคลอเฮกซิดีนขึ้นอยู่กับการเกาะติดบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งคลอเฮกซิดีนที่เป็นยาที่ใส่ในคลองรากฟันบริเวณเนื้อฟันส่วนรากฟัน การเกิดปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างชั้นเนื้อฟันและคลอเฮกซิดีน ต้องใช้เวลา 7 วัน[23, 24] จึงพิจารณาดูผลที่ระยะเวลา 7 วันและเป็นช่วงระยะเวลาที่นัดผู้ป่วยกลับมาเปลี่ยนยาในคลองรากฟัน ส่วน

การศึกษาผลที่ระยะเวลา 14 วัน เนื่องจากการศึกษาของ Gomes และคณะ [13] พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสได้ถึง 15 วัน ในขณะที่วันที่ 30 เจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสแล้ว การวิจัยครั้งนี้จึงทำการดูผลที่ระยะเวลา 14 วันและ 21 วัน เนื่องจากมีการศึกษาของ Lenet และคณะ[62] และพบว่าเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสได้นานถึง 21 วัน และเป็นข้อพิจารณาต่อไปถึงระยะเวลาในการใส่ยาในคลองรากฟันของคลอเฮกซิดีนในรูปแบบเจลและรูปแบบสารละลาย

ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคอนเซปซิสวีมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามเวลา แสดงถึงประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเพิ่มขึ้นตามเวลาและมีความคงตัวของประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อได้นานถึง 21 วัน ในขณะที่สารละลายคลอเฮกซิดีน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งในวันที่ 21 ลดลงจากวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญ แสดงถึงการลดลงของประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อหลังจากวันที่ 14 สอดคล้องกับศึกษาการศึกษาของ Lenet [62] ซึ่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านเชื้อในคลองรากฟันวัวที่ถูกถอนระหว่างคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่มีระบบควบคุมการนำส่งยา (controlled release delivery) เป็นแท่งกัตตาเปอร์ชา คลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 รูปแบบเจลและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ผสมน้ำเกลือ โดยใส่ยาในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสเพาะลงในคลองรากฟันเป็นเวลา 21 วัน จากนั้นตรวจวัดปริมาณเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสที่เจริญเติบโตในท่อเนื้อฟัน โดยวัดค่าความขุ่นของการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มที่ใส่เจลคลอเฮกซิดีนทุกความลึกของชั้นเนื้อฟันมีค่าความขุ่นของเชื้อ (optical density) ต่ำที่สุด แสดงว่าเจลคลอเฮกซิดีนสามารถยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสได้ดีกว่าสารละลายคลอเฮกซิดีนและแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เนื่องจากเจลสามารถเกาะตัวบนพื้นผิวได้ดี มีการคงอยู่ที่ผนังเด็นทินของคลองรากฟันได้นาน โดยเนื้อฟันมีองค์ประกอบหลักคือไฮดรอกซิอะพาไทท์ (hydroxyapatite) สามารถดูดซับประจุบวกของคลอเฮกซิดีนเข้าไปในท่อเนื้อฟันและค่อยๆปล่อยออกมาอย่างช้าๆส่งผลให้คงมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้นาน ดังนั้นการศึกษาต่อไปหลังจากนี้จึงควรทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น เมื่ออยู่ในคลองรากฟันจริง

เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสด้วยวิธี microbroth dilution สารละลายจะสัมผัสกับเชื้อได้ โดยตรงทำให้ไม่ผ่านการแพร่กระจายหรือตัวกลางต่างจากการทดสอบการแพร่บนวุ้น ดังนั้นการละลายและการแพร่ของ

สารจึงไม่มีผลต่อการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อซึ่งทำให้แปลผลได้ดีกว่าวิธีการทดสอบการแพร่บนวุ้น

โดยในการศึกษาวิจัยนี้ได้มีการใช้อะลามาร์บลูเป็นอินดิเคเตอร์ เนื่องจากเจลคลอเฮกซิดีนมีความใสสามารถแปลผลได้จากการเปลี่ยนแปลงของสีรีซาซูรินจากสีม่วงน้ำเงินสารเปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเกิดจากเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสที่มีชีวิตไปทำปฏิกิริยารีดักชันกับสาร แต่หากสีไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และการใช้อะลามาร์บลูมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบอย่างแท้จริง จึงนำมาใช้หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทำให้ผลมีความแม่นยำมากขึ้น อย่างไรก็ตามการแปลผลจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีรีซาซูริน อาจเกิดความคลาดเคลื่อนจากการสังเกตได้จึงมีการทำซ้ำในทุกการทดลอง พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อของแต่ละการทดลองมีค่าเท่ากัน จึงเชื่อได้ว่ามีความถูกต้องแม่นยำ

การศึกษาของ Lall และคณะ[63] ได้ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์(streptococcus mutans) และเชื้อพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (Prevotella intermedia) โดยเปรียบเทียบสารทดสอบ p-iodonitrotetrazolium violet (INT) เพรสโตบลู (PrestoBlue) และอะลามาร์บลู ผลการศึกษาพบว่าอะลามาร์บลูให้ผลที่แม่นยำในการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อมากกว่า p-iodonitrotetrazolium violet (INT)

โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นต่อเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสและเจลคลอคอนเซปซิสวีในงานวิจัยนี้พบว่าเท่ากับ 39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรคิดเป็น 0.0039% และ 19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรคิดเป็น 0.0019% ตามลำดับ แปลผลว่าเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวียับยั้งเชื้อได้ดีกว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น ซึ่งผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อมีความสอดคล้องกับการทดสอบการแพร่บนวุ้นที่พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวีมีค่าเฉลี่ยของโซนการยับยั้งมากกว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น

จากการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อพบว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นมีฤทธิ์การยับยั้งได้ดีไม่แตกต่างจากเจลคอนเซสซิปวี เนื่องจากนาโทรซอลที่เป็นองค์ประกอบของเจลมีความความสามารถในการละลายน้ำได้ใกล้เคียงกับไดเมทิโคนโพลีเมอร์ของเจลคอนเซปซิสวี ทำให้คลอเฮกซิดีนไอออนถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่ายสามารถสัมผัสกับแบคทีเรียได้ยาวนานมากขึ้น จากการศึกษาของ Irmaleny และคณะ[64] เปรียบเทียบระหว่างเจลคลอเฮกซิดีนและคลอเฮกซิดีนแอคทีฟพอยท์ (active point)

พบว่าคลอเฮกซิดีนแอคทีฟพอยท์มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสสูงกว่าเจลคลอเฮกซิดีน เนื่องจากพอยท์มีความแข็งมากกว่า จึงทำให้คลอเฮกซิดีนไอออนถูกปลดปล่อยออกมาได้ยากกว่าจึงต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่าในการยับยั้งเชื้อและการฆ่าเชื้อ

เมื่อพิจารณาถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส พบว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้นและเจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวีมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสไม่แตกต่างกัน มีค่าเท่ากับ 312 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรคิดเป็น 0.0312% โดยผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นต่ำกว่าจะเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจึงเกิดการฆ่าเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Arslan และคณะ[65]ที่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสของสารละลายคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมีค่าต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ เนื่องจากคลอเฮกซิดีนที่ความเข้มข้นต่ำกว่าจะเกิดการยับยั้งเชื้อ ในขณะที่คลอเฮกซิดีนที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเนื่องจากความเข้มข้นที่สูงทำให้เกิดการตกตะกอนของไซโตพลาสซึมและส่งเสริมให้เกิดการจับตัวของโปรตีนภายในเซลล์ได้[9]

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อของเจลคลอเฮกซิดีนในงานวิจัยในห้องปฏิบัติการมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้จริงในทางคลินิก อาจเนื่องมาจากภายในคลองรากฟันมีความซับซ้อนและจุลชีพในช่องปากมีการรวมกลุ่มกันหลายชนิดที่ติดบนพื้นผิวหรือไบโอฟิล์มซึ่งการที่เชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส มีการเจริญแบบไบโอฟิล์มทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของยาเข้าไปในเชื้อลดลง ซึ่งการที่ยาไม่สามารถฆ่าเชื้อที่อยู่ชั้นในของไบโอฟิล์มเป็นสาเหตุให้เชื้อที่เจริญแบบไบโอฟิล์มทนต่อยาได้สูงถึง 100-1000 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chanluang และคณะ[66] ที่พบว่าคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสแบบไบโอฟิล์ม คือ 3,125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็น 5 เท่าของค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อต่อเชื้อที่เจริญแบบอิสระที่ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากการที่เชื้อเจริญแบบไบโอฟิล์มเป็นกลไกหนึ่งที่เชื้อมักใช้ในการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดในสภาวะที่มีอาหารจำกัดหรือทนต่อการป้องกันตนเองจากระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย

การทดสอบด้วยวิธี broth microdilution สามารถนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของเจลคลอเฮกซิดีน การศึกษานี้เลือกความเข้มข้นร้อยละ 2 เนื่องจากความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่เพียงพอ จากผลการวิจัยครั้งนี้พบได้ว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อของเชื้อที่เจริญแบบอิสระต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุด

ในการฆ่าเชื้อที่ใช้จริงในทางคลินิกที่เชื้อมีการเจริญแบบไบโอฟิล์มถึง 6 เท่า ดังนั้นในการใช้งานทางคลินิกจึงมีการใช้เจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 เพื่อให้มีความเข้มข้นและประสิทธิภาพที่เพียงพอในการต้านเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีการจำหน่ายในต่างประเทศและพัฒนาใช้ในปัจจุบัน

ข้อเสนอแนะ

ภายใต้ข้อจำกัดจากการศึกษาของการศึกษาในห้องปฏิบัติการครั้งนี้สรุปได้ว่าเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น เจลคอนเซปซิสวี และสารละลายคลอเฮกซิดีน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิส โดยเจลคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่พัฒนาขึ้นและเจลคอนเซปซิสวีมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน สามารถยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสได้นานถึง 21 วัน ในขณะที่สารละลายคลอเฮกซิดีนสามารถยับยั้งเชื้อเอ็นเทอโรคอคคัสฟีคัลลิสได้เพียง 14 วัน ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำไปพัฒนาการผลิตเจลขึ้นเองภายในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาศรีนครินทรวิโรฒจึงควรมีการศึกษาต่อไปถึงประสิทธิภาพการต้านเชื้อในคลองรากฟันจริง รวมถึงภายในคลองรากฟันมีความซับซ้อนและจุลชีพในช่องปากมีการรวมกลุ่มกันหลายชนิดที่ติดบนพื้นผิวหรือไบโอฟิล์ม อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้สามารถนำองค์ความรู้มาเป็นพื้นฐานในการศึกษาเพื่อพัฒนามาใช้ในผู้ป่วยจริงต่อไป

บรรณานุกรม

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20:340-9.

2. Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections: a review. Stomatologija. 2008;10(1):4-9.

3. Ricucci D, Siqueira JF. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. J Endod. 2010;36(1):1-15.

4. Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. Int Endod J. 2001;34(1):1-10.

5. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. Odontol Tidskr. 1966;74(5):1-380.

6. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(1):86-93.

7. Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M. Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide in Endodontics: A Review. Chonnam Medical Journal. 2012;48(3):133-40.

8. Krithikadatta J, Indira R, Dorothykalyani AL. Disinfection of dentinal tubules with 2% chlorhexidine, 2% metronidazole, bioactive glass when compared with calcium hydroxide as intracanal medicaments. J Endod. 2007;33(12):1473-6.

9. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J. 2009;42(4):288-302.

10. Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. J Endod. 2007;33(7):788-95.

11. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. Aust Dent J. 2007;2007(52):64-82.

12. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of

the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Brazilian dental journal. 2007;18(4):294-8.

13. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. Int Endod J. 2003;36(4):267-75.

14. Gomes-Filho JE, Aurélio KG, Costa MMTdM, Bernabé PFE. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. J Appl Oral Sci. 2008;16(2):137-44.

15. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. Aust Endod J. 2009;35(3):131-9.

16. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against Enterococcus faecalis in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;96(5):618-24.

17. Afridi RU, Shah SA, Rehman S, Jan IU, Shah FA, Ali A. Comparison of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel as intracanal medications in reducing postoperative pain in molar teeth with apical periodontitis and necrotic pulp-randomized clinical trials. Journal of Khyber College of Dentistry. 2019;9(2):1-5.

18. Mathew R, Sukumaran AS, Singh P, Varughese AV. Evaluation of the efficacy of different intracanal medicaments against Candida albicans and Enterococcus faecalis - An In-Vitro study. Indian J Dent Res. 2022;33(4):440-4.

19. Silva A, Pinto S, Santos E, Santos F, Farago P, Gomes J, et al. New intracanal formulations containing doxycycline or chlorhexidine against Enterococcus faecalis. J Contemp Dent Pract. 2014;15(1):61-5.

20. CâmaraDeBem SH, Estrela C, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Determination of chemical components derived from 2% chlorhexidine gel degradation using gas chromatography-mass spectrometry. Acta Odontol Scand. 2014;72(8):630-8.

21. Sharifian MR, Shokouhinejad N, Aligholi M, Emaneini M, Katebi A, Assadian H. In Vitro Comparison of the Effectiveness of Chlorhexidine and Two Calcium Hydroxide Formulations on Enterococcus Faecalis. Iran Endod J. 2008;3(3):50-8.

22. Mahendra A, Koul M, Upadhyay V, Dwivedid R. Comparative evaluation of antimicrobial substantivity of different concentrations of chlorhexidine as a root canal irrigant: An in vitro study. J Oral Biol Craniofac Res. 2014;4(3):181-5.

23. Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)2 in preventing secondary infection of dentinal tubules. Int Endod J. 1992;25(1):20-4.

24. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. J Endod. 2000;26(6):315-7.

25. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. Int Endod J. 2004;37(1):38-41.

26. Khademi A, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. Aust Endod J. 2006;32(3):112-5.

27. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;98(4):488-92.

28. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJd. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(1):79-84.

29. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. J Endod. 2001;27(3):452-5.

30. Ercan Er, Dalli M, Dülgergil ÇT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against Enterococcus faecalis and Candida albicans. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102(2).

31. Waltimo TM, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibility of Candida albicans to four disinfectants and their combinations. Int Endod J. 1999;32(6):421-9.

32. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. J Endod.

2003;29(5):338-9.

33. Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. Int Endod J. 2003;36(2):100-5.

34. Rathod H, Mehta D. A Review on Pharmaceutical Gel. International Journal of Pharmaceutical Sciences 2015;1(1):33-47.

35. Zalivskaya A, Fadeeva D, Shestopalova N, Avtina N, Radyukova V, Ivanova V. Comparative characteristics of gel bases for semisolid dosage forms BIO Web of Conferences. 2021;40:1-9.

36. นิ่มกุลรัตน์ ส. สารเพิ่มความหนืด. เทคโนโลยีเภสัชกรรม 2. 2548;6:85-94.

37. Fini A, Bergamante V, Ceschel GC. Mucoadhesive gels designed for the controlled release of chlorhexidine in the oral cavity. Pharmaceutics. 2011;3(4):665-79.

38. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Hydroxyethyl Cellulose. Handbook of Pharmaceutical excipients. 2009;340-3.

39. Zulkifli FH, Hussain FSJ, Rasad MSBA, Yusoff MM. Nanostructured materials from hydroxyethyl cellulose for skin tissue engineering. Carbohydr Polym. 2014;19(114):238-45.

40. Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against Enterococcus faecalis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99(6):768-72.

41. Love R. Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2201;34(5):399-405.

42. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of Enterococcus faecalis to calcium hydroxide. Int Endod J. 2002;35(3).

43. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of Enterococcus faecalis in human serum. Oral Microbiol Immunol. 2003;18(4):234-9.

44. Zehnder M, Guggenheim. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. Int Endod J. 2009;42(4):277-87.

45. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J

Endod. 2002;28(10):689-93.

46. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis. 2009;49(11):1749-55.

47. Jorgensen J, Ferraro M. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis. 1998;26(4):973-80.

48. Alonso CA, Domínguez C, Heras J, Mata E, Pascual V, Torres C, et al. Antibiogramj: A tool for analysing images from disk diffusion tests. Comput Methods Programs Biomed. 2017;143:159-69.

49. Song D, Lei Y. Mini-review: Recent advances in imaging-based rapid antibiotic susceptibility testing Sensors and Actuators Reports. 2021;3:10053.

50. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur J Biochem. 2000;17:5421-6.

51. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. Biotechnol Lett. 2016;38(6):1015-9.

52. Saeed SI, Aklilu E, Mohammedsalih KM, Adekola AA, Mergani AE, Mohamad M, et al. Antibacterial Activity of Ikarugamycin against Intracellular Staphylococcus aureus in Bovine Mammary Epithelial Cells In Vitro Infection Model. Biology (Basel). 2021;10(10):958.

53. Bielec F, Brauncajs M, Pastuszak-Lewandoska D. Comparison of Substance Sources in Experimental Antimicrobial Susceptibility Testing. Sci Pharm. 2023;91(1):1-7.

54. Lalitha MK. Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing. Performance standards for antimicrobial testing: Twelfth Informational Supplement. 2004:5-6.

55. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. 2009:1-23.

56. Ledeboer NA, Das K, Eveland M, Roger-Dalbert C, Mailler S, Chatellier S, et al. Evaluation of a novel chromogenic agar medium for isolation and differentiation of vancomycin-resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolates. J Clin

Microbiol. 2007;45(5):1556-60.

57. Abbaszadegan A, Gholami A, Ghahramani Y, Ghareghan R, Ghareghan M, Kazemi A, et al. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Cuminum Cyminum as an Intracanal Medicament Compared to Chlorhexidine Gel. Iran Endod J. 2016;11(1):44-50.

58. Cockerill FR. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012;29(1):12-3.

59. Rôças IN, Jr JFS, Santos KRN. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004;30(5):315-20.

60. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagn Lab Immunol. 1999;6(3):437-9.

61. Davis W, Stout T. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. Appl Microbiol. 1971;22(4):659-65.

62. Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, et al. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. J Endod. 2000;26(11):652-5.

63. Lall N, Henley-Smith C, Canha MD, Oosthuizen C, Berrington D. Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. Int J Microbiol. 2013(9):1-5.

64. Irmaleny, Yolanda, Susilawati S, Gartika M, Dewi PY, Fitri SR, et al. Which is More Effective as Intracanal Medicament on Enterococcus Faecalis Chlorhexidine GelTM or Activ PointTM? Journal of International Dental and Medical Research. 2023;16(3):1091-7.

65. Arslan S, Ozbilge H, Kaya EG, Er O. In vitro antimicrobial activity of propolis, BioPure MTAD, sodium hypochlorite, and chlorhexidine on Enterococcus faecalis and Candida albicans. Saudi Med J. 2011;32(5).

66. Chanluang S, Arlai S, Srilakorn W, Pengkumsri N. Antimicrobial Activity of Alpinia conchigera Extract on Enterococcus faecalis Biofilm. Thai Pharm Health Sci J. 2010;5(4):279-86.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 การทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล

Test of Normality

	Group	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig	Statistic	df	Sig
Day1	2% CHX consepsisV	0.125	9	0.200*	0.951	9	0.696
	2% CHX solution	0.246	9	0.123	0.912	9	0.333
	2% CHX gel	0.204	9	0.200*	0.940	9	0.586
Day7	2% CHX consepsisV	0.227	9	0.198	0.859	9	0.093
	2% CHX solution	0.228	9	0.195	0.933	9	0.506
	2% CHX gel	0.313	9	0.011	0.859	9	0.094
Day14	2% CHX consepsisV	0.274	9	0.050	0.883	9	0.168
	2% CHX solution	0.224	9	0.200*	0.894	9	0.217
	2% CHX gel	0.227	9	0.199	0.926	9	0.447
Day21	2% CHX consepsisV	0.274	9	0.050	0.854	9	0.083
	2% CHX solution	0.186	9	0.200*	0.941	9	0.588
	2% CHX gel	0.171	9	0.200*	0.972	9	0.915

*แสดงถึง lower bound มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

a. Lilliefors Significance Correction

ตารางที่ 2 การวัดความน่าเชื่อถือภายในผู้ประเมินด้วยสถิติสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในชั้น

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation[b]	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	df1	df2	df3	df4
Single Measures	0.867[a]	0.186	0.985	14.000	4	4	0.013
Average Measures	0.929[c]	0.314	0.993	14.000	4	4	0.013

Two-way mixed effects model where people effect are random and measures effects are fixed

a. The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

b. Type C intraclass correlation coefficients using a consistency definition. The between-measure variance is excluded from the denominator variance.

c. This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimate otherwise.

ตาราง 3 การเปรียบเทียบผลภายในกลุ่ม (Tests of Within-Subjects Effects)

Source		Type III Sum of squares	df	Mean square	F	Sig	Partial Eta Squared
Day	Sphericity Assumed	27.833	3	9.278	31.747	0.000	0.569
	Greenhouse-Geisser	27.833	1.938	14.359	31.747	0.000	0.569
	Huynh-Feldt	27.833	2.282	12.199	31.747	0.000	0.569
	Lower-bound	27.833	1.000	27.833	31.747	0.000	0.569
Day* Group	Sphericity Assumed	4.000	6	0.667	2.281	0.045	0.160
	Greenhouse-Geisser	4.000	3.877	1.032	2.281	0.077	0.160
	Huynh-Feldt	4.000	4.563	0.877	2.281	0.064	0.160
	Lower-bound	4.000	2.000	2.000	2.281	0.124	0.160
Error (day)	Sphericity Assumed	21.042	72	0.292			
	Greenhouse-Geisser	21.042	46.521	0.452			
	Huynh-Feldt	21.042	54.759	0.384			
	Lower-bound	21.042	24.000	0.877			

ตาราง 4 การเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่ม (Tests of Between-Subjects Effects)

Source	Type III Sum of squares	df	Mean square	F	Sig	Partial Eta Squared
Intercept	38307.000	1	38307.000	14092.931	0.000	0.998
Group	216.889	2	108.444	39.896	0.000	0.769
Error	65.236	24	2.718			

ตาราง 5 การเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น เจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี และสารละลายคลอเฮกซิดีนด้วยสถิติความแปรปรวนสองทางแบบวัดซ้ำ (Two-way repeated measure ANOVA)

Descriptive Statistics

	Group	Mean	Std. Deviation	N
Day 1	2% CHX ConsepsisV	17.111	0.8580	9
	2% CHX Solution	20.222	1.5635	9
	2% CHX gel	16.889	0.6009	9
	Total	18.074	1.8693	27
Day 7	2% CHX ConsepsisV	17.778	0.6667	9
	2% CHX Solution	21.000	1.1180	9
	2% CHX gel	17.444	0.6346	9
	Total	18.741	1.8207	27
Day 14	2% CHX ConsepsisV	18.556	0.7683	9
	2% CHX Solution	21.500	1.2990	9
	2% CHX gel	18.333	0.7500	9
	Total	19.463	1.7427	27
Day 21	2% CHX ConsepsisV	18.333	0.6124	9
	2% CHX Solution	20.611	1.1667	9
	2% CHX gel	18.222	0.7546	9
	Total	19.056	1.4028	27

ตาราง 6 การเปรียบเทียบรายคู่ของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น เจลคลอเฮกซิดีนคอนเซปซิสวี และสารละลายคลอเฮกซิดีนด้วยสถิติการเปรียบเทียบแพร์ไวส์ (Pairwise comparison)

Pairwise comparisons

Day	(I)Group	(J)Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig[b]	95%Confidence intervalfor Difference[b] Lower Bound	Upper Bound
1	2% CHX consepsisV	2% CHX solution	-3.111*	0.512	0.000	-4.425	-1.797
		2% CHX gel	0.222	0.512	0.963	-1.092	1.537
	2% CHX solution	2% CHX consepsisV	3.111*	0.512	0.000	1.797	4.425
		2% CHX gel	3.333*	0.512	0.000	2.019	4.648
	2% CHX gel	2% CHX consepsisV	-0.222	0.512	0.963	-1.537	1.092
		2% CHX solution	-3.333*	0.512	0.000	-4.648	-2.019
7	2% CHX consepsisV	2% CHX solution	-3.222*	0.394	0.000	-4.234	-2.211
		2% CHX gel	0.333	0.394	0.790	-0.678	1.345
	2% CHX solution	2% CHX consepsisV	3.222*	0.394	0.000	2.211	4.234
		2% CHX gel	3.556*	0.394	0.000	2.544	4.567
	2% CHX gel	2% CHX consepsisV	-0.333	0.394	0.790	-1.345	0.678
		2% CHX solution	-3.556*	0.394	0.000	-4.567	-2.544
14	2% CHX consepsisV	2% CHX solution	-2.944*	0.459	0.000	-4.121	-1.767
		2% CHX gel	0.222	0.459	0.950	-0.955	1.399
	2% CHX solution	2% CHX consepsisV	2.944*	0.459	0.000	1.767	4.121
		2% CHX gel	3.167*	0.459	0.000	1.990	4.344
	2% CHX gel	2% CHX consepsisV	-0.222	0.459	0.950	-1.399	0.955
		2% CHX solution	-3.167*	0.459	0.000	-4.344	-1.990
21	2% CHX consepsisV	2% CHX solution	-2.278*	0.413	0.000	-3.338	-1.217
		2% CHX gel	0.111	0.413	0.991	-0.949	1.172
	2% CHX solution	2% CHX consepsisV	2.278*	0.413	0.000	1.217	3.338

	2% CHX gel	2.389*	0.413	0.000	1.328	3.449
2% CHX gel	2% CHX consepsisV	-0.111	0.413	0.991	-1.172	0.949
	2% CHX solution	-2.389*	0.413	0.000	-3.449	-1.328

*แสดงถึงค่า mean difference มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความสำคัญ 0.5

b คือการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยการทดสอบดันน์-ซีแดค (Duun-Sidak test)

ตาราง 7 การเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งของเจลคอนเซปซิสวี ด้วยสถิติความแปรปรวนทางเดียวแบบวัดซ้ำ (One-way repeated measure ANOVA)

Pairwise Comparisons[a]

(I) Day	(J) Day	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig[c]	95% Confidence interval for Difference[C]	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-0.667	0.276	0.229	-1.624	0.291
	3	-1.444*	0.377	0.030	-2.750	-0.139
	4	-1.222*	0.345	0.044	-2.416	-0.028
2	1	0.667	0.276	0.029	-0.291	1.624
	3	-0.778*	0.188	0.020	-1.430	-0.125
	4	-0.556*	0.155	0.042	-1.091	-0.020
3	1	1.444*	0.377	0.030	0.139	2.750
	2	0.778*	0.188	0.020	0.125	1.430
	4	0.222	0.088	0.194	-0.082	0.527
4	1	1.222*	0.345	0.044	0.028	2.416
	2	0.556*	0.155	0.042	0.020	1.091
	3	-0.222	0.088	0.194	-0.527	0.082

*แสดงถึงค่า mean difference มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความสำคัญ 0.5

a กลุ่ม 2%เจลคอนเซปซิสวี

c คือการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยการทดสอบดันน์-ซีแดค (Duun-Sidak test)

ตาราง 8 การวิเคราะห์เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งของสารละลายคลอเฮกซิดีน ด้วยสถิติความแปรปรวนทางเดียวแบบวัดซ้ำ (One-way repeated measure ANOVA)

Pairwise Comparisons[a]

(I) Day	(J) Day	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig[c]	95% Confidence interval for Difference[C]	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-0.778	0.290	0.156	-1.782	0.227
	3	-1.278*	0.278	0.010	-2.240	-0.315
	4	-0.389	0.200	0.425	-1.083	0.305
2	1	0.778	0.290	0.156	-0.227	1.782
	3	-0.500	0.333	0.678	-1.655	0.655
	4	0.389	0.232	0.575	-0.416	1.194
3	1	1.278*	0.278	0.010	0.315	2.240
	2	0.500	0.333	0.678	-0.655	1.655
	4	0.889*	0.162	0.003	0.328	1.450
4	1	0.389	0.200	0.425	-0.305	1.083
	2	-0.389	0.232	0.575	-1.194	0.416
	3	-0.889*	0.162	0.003	-1.450	-0.328

*แสดงถึงค่า mean difference มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความสำคัญ 0.5

a กลุ่ม 2% สารละลายคลอเฮกซิดีน

c คือการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยการทดสอบดันน์-ซีแดค (Duun-Sidak test)

ตาราง 9 การวิเคราะห์เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งของเจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น ด้วยสถิติความแปรปรวนทางเดียวแบบวัดซ้ำ (One-way repeated measure ANOVA)

Pairwise Comparisons[a]

(I) Day	(J) Day	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig[c]	95% Confidence interval for Difference	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-0.556	0.306	0.491	-1.614	0.503
	3	-1.444*	0.306	0.009	-2.503	-0.386
	4	-1.333*	0.333	0.023	-2.488	-0.179
2	1	0.556	0.306	0.491	-0.503	1.614
	3	-0.889*	0.200	0.013	-1.583	-0.195
	4	-0.778*	0.169	0.010	-1.363	-0.192
3	1	1.444*	0.306	0.009	0.386	2.503
	2	0.889*	0.200	0.013	0.195	1.583
	4	0.111	0.073	0.671	-0.143	0.366
4	1	1.333*	0.333	0.023	0.179	2.488
	2	0.778*	0.169	0.010	0.192	1.363
	3	-0.111	0.073	0.671	-0.366	0.143

*แสดงถึงค่า mean difference มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความสำคัญ 0.5

a กลุ่ม 2% เจลคลอเฮกซิดีนที่พัฒนาขึ้น

c คือการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยการทดสอบดันน์-ซีแดค (Duun-Sidak test)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศิริลักษณ์ คำประพันธ์
วัน เดือน ปี เกิด	23 กันยายน 2535
สถานที่เกิด	เชียงใหม่
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2560 ทันตแพทยศาสตร์บัณฑิต จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่ปัจจุบัน	ห้อง406 หอพักเดอะชาโต้วิลเลขที่ 51 ซอยลาดพร้าว 35 ถนน ลาดพร้าว แขวง จันทรเกษม เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900